UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES AMINES DU VIN

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacien)

Présentée par **Janine BLANC-GUENEE**

Pharmacien

Attachée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique
Ancien Interne des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine

Soutenue le 30 Novembre 1961, devant la Commission d'examen

JURY
MM. J.A. GAUTIER, Président
P. MALANGEAU, Professeur
A. MANGEOT, Maître de Conférences

DACTYLO-SORBONNE
8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI^e^
1961

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538121_0013

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES AMINES DU VIN

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Pharmacien)

Présentée par **Janine BLANC-GUENEE**

Pharmacien

Attachée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique
Ancien Interne des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine

Soutenue le 30 Novembre 1961, devant la Commission d'examen

JURY
MM. J.A. GAUTIER, Président
P. MALANGEAU, Professeur
A. MANGEOT, Maître de Conférences

DACTYLO-SORBONNE
8, Rue Casimir-Delavigne
PARIS-VI^e^
1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PERSONNEL

DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

Administration

MM. G. VALETTE, Doyen

M-M. JANOT, Asseseur

G. CUVIER, Secrétaire Général

L. JEANDEL, Secrétaire Général-Adjoint

Mme S. CERTAIN, Secrétaire

Mme M-L. ESPINASSE, Secrétaire.

Doyen Honoraire

M. René FABRE, Membre de l'Institut

Professeurs Honoraires

MM. René FABRE, Membre de l'Institut

DELEPINE, Membre de l'Institut

LAUNOY,

FLEURY,

MASCRE,

PICON,

BEDEL

Professeurs

MM.	M-M JANOT,	Pharmacie galénique (T)
	G. VALETTE	Pharmacodynamie (T)
	R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
	M. GUILLOT	Physique (T)
	J. GAUTIER	Chimie organique (T)
Melle	S. LAMBIN	Microbiologie (T)

MM.	Y. RAOUL	Zoologie appliquée (T)
	J. COURTOIS	Chimie biologique (T)
	L. DOMANGE	Chimie minérale (T)
	P. CRETE	Botanique (T)
	R. TRUHAUT,	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
	A. MORETTE	Hydrologie (T)
	R. CAVIER	Parasitologie (T)
	A. QUEVAUVILLER	Hygiène et Education sanitaire
	R. MOREAU	Pharmacie chimique (T)
	J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
	A. GERMAN	Virologie et sérologie (T.P.)
	M. PIETTE	Biologie sanguine (TP)
	P. MALANGEAU	Chimie analytique (T)
	M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T)
	G. DILLEMANN	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
	G. DEYSSON	Professeur sans chaire
	J. FLAHAUT	Professeur sans chaire
	J. RENAULT	Professeur sans chaire
	A. LE HIR	Professeur sans chaire
	C. BOUDENE	Professeur sans chaire

Maîtres de Conférences

MM.	P. LARUELLE	Physique
	G. LE MOAN	Toxicologie
	P. ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
	H. RENAULT	Pharmacie chimique
	G. PAOLETTI	Radio-isotopes. Applications à la biologie et à la Pharmacie
	A. MANGEOT	Chimie analytique
	P. DELAVEAU	Biologie végétale
	P. REYNAUD	Sciences physico-chimiques
	A. DESVIGNES	Microbiologie
	F. PERCHERON	Biochimie
	J. SAVEL	Sciences naturelles

J. BORY — Sciences naturelles

Chefs de Travaux Pratiques

MM. P. BINET	Biologie animale
P. CORRIEZ	Physique
J. DUCHENNE	Microbiologie
J. GARDENT	Chimie analytique 1ère année
P. GESTEAU	Physique biologique
J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
J. HENRY	Chimie (4ème année)
M. LECLERC	Chimie biologique
R. LELUC	Microbiologie
M. LEMONNIER	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
Melle S. LONGUEVALLE	Service des examens de chimie
MM. F. PELLERIN	Chimie analytique (2ème et 3ème années)
P. POULLAIN	Hématologie
Mme M. ROBERT	Sérologie
Melle A. ROLLEN	Biologie végétale

Institut de Pharmacotechnie et de Pharmacodynamie

M. A. CAVE	Chef de travaux de Pharmacotechnie galénique
Melle H. MORIN	Chef de travaux de pharmacodynamie
M. ROBBA	Chef de travaux de pharmacotechnie chimique

Bibliothèque

Melle RUYSSEN	Conservateur chargé de la Direction
Melle LAVAUD	Conservateur
Mme DESGRIPPES	Bibliothécaire
KREHMER	Bibliothécaire

-:-

A Monsieur J.A. GAUTIER

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques
de la Seine
Membre de l'Académie Nationale de Médecine
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui nous a fait l'honneur de diriger nos recherches et d'accepter la présidence de notre jury de thèse.
Il a suscité ce travail et il nous a prodigué le soutien inappréciable de son expérience et de son talent à toutes les étapes d'une élaboration souvent difficile.
Nous lui exprimons notre profonde reconnaissance et notre respectueux attachement.

A Monsieur P. MALANGEAU

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien-Chef des Hôpitaux Psychiatriques
de la Seine

Qui a bien voulu accepter de juger
ce travail.
Nos sentiments respectueux

A Monsieur A. MANGEOT

Maitre de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris
Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Qui a bien voulu accepter de siéger
dans notre jury.
Avec l'expression de notre respectueuse
gratitude.

A mon Mari,

A ma Famille,

A mes Amis.

CONTRIBUTION A L'ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES AMINES DU VIN

-:-

INTRODUCTION

-:-

Ce travail a été entrepris en 1954. A cette date, peu d'études avaient été consacrées aux acides aminés des boissons et particulièrement des vins. On ignorait si les acides aminés constituaient une fraction sensible de l'azote des vins et quelle pouvait être en conséquence l'importance qualitative et quantitative de cet apport d'amino-acides dans la ration alimentaire.

La question de l'azote des vins, quand nous avons abordé ce problème, était à peu près limitée aux notions classiques sur les taux des diverses formes azotées évaluées par voie chimique.

RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (74) admettaient qu'il peut exister dans les vins quelques grammes par litre de substances azotées, soit environ 20 % de l'extrait sec.

Une méthode colorimétrique rapide de dosage de l'azote total du vin avait été proposée en 1951 par GARCIA et FREYRE (cités par AMERINE) (3)(+). Cependant presque tous les auteurs ont dosé l'azote total par la méthode classique de Kjeldahl. Tous s'accordent à reconnaître que cette teneur est éminemment variable avec le cépage, le climat, les conditions de culture, de récolte et, pour les vins, le mode de vinification.

La teneur en azote total oscille autour de 300 mg par litre de vin. Les valeurs extrêmes que nous ayons relevées dans la littérature sont les suivantes :

(+) Certaines références se rapportent à des revues étrangères peu accessibles ; nous avons été amenée parfois, en conséquence, à utiliser le rapport qu'en ont fait d'autres auteurs ; nous le précisons alors dans notre propre texte.

moûts :	minimum 56 mg par litre	:	raisin noir, CASALE 1934 (cité par PEYNAUD) (66)
	maximum 929 mg " "	:	pinot rouge, VALAIZE et DUPONT 1951 (85)
vins :	minimum 46 mg " "	:	vin blanc italien, (cité par AMERINE) (3)
	maximum 980 mg " "	:	vin blanc allemand, (cité par AMBRINE) (3)

Les taux d'azote total sont plus élevés dans les moûts que les vins, et dans les vins rouges que dans les vins blancs.

L'azote ammoniacal atteint fréquemment le taux de 200 mg par litre dans les moûts, on en retrouve environ dix fois moins dans les vins.

La majeure partie de l'azote des vins est donc sous forme organique ; mais quelles sont les diverses fractions de cet azote et quelle en est la distribution quantitative ?

GARINO-CANINA (cité par PEYNAUD) (65) est sans doute le premier en 1919 à doser l'azote aminé des vins ; en appliquant la méthode de formol-titration de Sörensen, il obtient des taux de 2,2 à 91 mg par litre.

En 1934 MUTH et MALSCH (54) publient des résultats sensiblement plus élevés obtenus par la technique de Willstaetter qui révèle l'acidité des acides aminés en milieu alcoolique à 80° en présence de thymolphtaléine.

VENEZIA (in PEYNAUD) (65) dose en 1935 l'azote aminé de 42 vins italiens par la méthode de Van Slyke (nitrite de sodium en milieu acide) ; ces vins renferment de 56 à 245 mg d'azote aminé par litre. Les trois méthodes de dosage ne sont d'ailleurs pas équivalentes. Le dosage des acides aminés par protométrie de leurs carboxyles conduit à des chiffres plus élevés que ceux obtenus en évaluant, selon Van Slyke l'azote de leurs fonctions aminées, parce que par la première méthode on dose aussi partiellement les polypeptides (RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD) (74).

SISAKYAN et BEZINGER (77) ont dosé successivement les acides aminés par décarboxylation de leur fonction COOH (Van Slyke - ninhydrine) et par la mesure de l'azote de leur fonction NH_2 (Van Slyke-NO_2H). Les résultats de cette deuxième méthode sont toujours moins élevés; les auteurs estiment que cette différence est due à la proline qui n'a pas de radical NH_2 libre ; et ils considèrent le chiffre exprimant cette différence comme un taux approché de la proline dans les échantillons analysés.

Les valeurs généralement admises pour l'azote aminé des vins sont de l'ordre de 100 à 200 mg par litre ; mais si on les exprime en pourcentage de l'azote total, on se rend compte de la diversité des résultats ; plusieurs mémoires étrangers, postérieurs à l'époque que nous visons, ne font que confirmer les divergences (Tableau I).

Tableau I

Auteurs	Echantillons	Pourcentage d'azote aminé dosé
PEYNAUD 1939 (65)	Vins blancs	10-25 % de l'azote organique
	Vins rouges	20-40 % " " "
SISAKYAN et BEZINGER 1949 (77)	Vins de Géorgie	45 % de l'azote total
TARANTOLA et LOVISOLO 1955 (82)	2 moûts "Moscato di Canelli"	9,1 et 14,4 % " "
COLAGRANDE 1957 (22)	2 moûts et 6 vins	crdre de 10 % " "
CATALANO 1957 (21)	Vins rouges blancs et rosés	25 à 30 % " "
BOURDET et HERARD 1958 (13)	Vin rouge	48,5 % " "
	Vin blanc	32 % " "

A côté de l'azote aminé on a caractérisé dans les vins d'autres formes azotées : azote protéique, amidé, polypeptidique...

Le premier bilan azoté est dû à MUTH et MALSCH (54) (voir tableau II).

Tableau II

Bilan azoté dans des vins de Geisenheim (MUTH et MALSCH 1934) (54) en mg par litre

	N album.	N total	N NH_3	N du p^té phospho-tung.	N aminé avt hyd.	N aminé après hyd.	N humique	N total des fract. dosées
1931	13,3	665,5	45,0	313,6	223,3	274,5	9,2	655,6
1932	10,5	376,8	19,1	145,4	-	194,2	9,8	379,0
1933	11,2	536,5	35,4	224,0	203,7	251,1	9,4	530,8
1904	7,2	301,2	15,9	120,9	120,2	148,0	9,1	284,2

La technique suivie par les auteurs est la suivante : on précipite l'azote albuminé par l'alcool à 80° en milieu acide et en présence de sulfate de sodium ; dans le filtrat alcalinisé on évalue l'azote ammoniacal ; la solution acidifiée est additionnée d'acide phospho-tungstique ; on sépare le précipité ; le filtrat sert à doser l'azote aminé par la méthode de Willstaetter. On fait enfin un nouveau dosage d'azote aminé après hydrolyse de la solution par HCl environ 2 N.

Comme on peut le voir sur le tableau II, il y a identité de résultats entre l'azote total évalué par la méthode de Kjeldahl et l'azote des fractions dosées.

GENEVOIS et RIBEREAU-GAYON (1936) (32) et PEYNAUD (1939) (65) ont analysé un grand nombre d'échantillons de vins ; à partir de leurs résultats, on peut représenter la "carte azotée" des vins par le schéma simplifié ci-dessous : (Tableau III)

Tableau III

Les différentes formes de l'azoté des vins

N.Organique 300-600mg/ℓ	1) N.protéique	P.M. > 10.000	p^te par alcool 80°	3 % de N.total
	2) N. des peptones et albumoses	1000 < P.M. < 10.000	peptones+certains polypeptides p^tent p " par acide phosphotungstique	60-90% de N. orga.
	3) N. des polypeptides	P.M < P.M.peptones		
	4) N.aminé	P.M. ordre de 300		10-40% de N.orga.
	5) N. amidé			1-2% de N.orga.
N.minéral 0-200 mg/ℓ				

PEYNAUD (67) a publié en 1950 les analyses complètes de 12 vins de Bordeaux et de 8 vins doux naturels. Les résultats sont en accord avec le schéma ci-dessus.

Cependant pour d'autres auteurs, la somme des fractions azotées dosables conduit à un bilan incomplet.

HENNIG (34) publie en 1944 les analyses d'un Riesling échelonnées sur dix-neuf années de 1904 à 1942. Après dosage de l'azote protéique, ammoniacal, phospho-tungstique, humique et amidé, il reste encore un azote résiduel correspondant à 20 % en moyenne de l'azote total, ce qui évidemment est loin d'être négligeable.

De 1945 à 1949 OPARIN et Coll. (58 à 60) ont étudié la composition azotée du "Champagne" russe ; ils ont signalé la présence de composés échappant au dosage selon Van Slyke et qui seraient selon eux, des combinaisons assez mal définies d'acides aminés et de sucres.

L'accord n'était donc pas fait entre les auteurs sur les fractions azotées du vin, lorsque nous avons commencé ce travail. Par ailleurs nous avions eu connaissance des premiers travaux sur la chromatographie des acides aminés du vin ; nous nous proposons de les examiner au chapitre consacré à cette technique.

Depuis cette époque les connaissances sur l'azote des vins ont beaucoup progressé ; la chromatographie sur papier a permis d'identifier ou même de doser dans les vins et les moûts, une trentaine d'acides aminés.

Dans un souci de plus complète information, nous ferons état, au cours de notre étude, des nombreux travaux parus de 1954 à 1960 que nous ne connaissions pas au départ. D'ores et déjà, signalons que la multiplication des résultats publiés, n'a pas pour autant résolu entièrement les problèmes posés par la composition complexe du vin et l'évolution des moûts en fermentation ; encore aujourd'hui maints désaccords subsistent, ainsi qu'il apparaît si l'on étudie les données relatives au bilan azote.

TARANTOLA et LOVISOLO (1955) (82) et CATALANO (1957) (21) ont dosé les substances azotées de moûts et de vins italiens sous leurs diverses formes de combinaison ; comme HENNIG, ils estiment qu'après les dosages classiques des formes azotées, il reste dans la solution une teneur correspondant selon les échantillons, à 18 à 35 % de l'azote total et qui n'a pu être identifiée. Il serait peu logique d'admettre que cette forme inconnue d'azote soit particulière aux vins étrangers.

Récemment BOURDET et HERARD en 1958 (13) en étudiant les composés azotés de deux vins ordinaires et de trois vins de lie français, sont arrivés à cette même conclusion que le bilan azoté des vins tel que permettaient de l'établir les analyses classiques étaient incomplets. La somme des diverses fractions (N aminé + N amidé + N polypeptidique + N protéique) ne représente environ que 50 à 60 % de l'azote total. De plus les auteurs soulignent combien

est imprécise la composition du précipité phospho-tungstique. Ce réactif est en effet susceptible de précipiter des substances de nature protéique, peptonique, polypeptidique, à côté des acides diaminés : arginine, lysine, histidine et peut-être partiellement la cystine.

D'ailleurs même en faisant entrer cet azote phosphotungstique dans le bilan, on ne parvient pas à l'équilibrer.

BOURDET et HERARD ont alors envisagé d'exprimer d'une façon nouvelle l'azote aminé. Ils ont fait la somme des équivalents azotés de tous les acides aminés dosés par chromatographie. Exprimées de cette manière, les teneurs en azote aminé des vins étudiés sont toutes supérieures à celles obtenues par formol-titration. On savait que la méthode de Sörensen conduisait à des résultats déficitaires, mais ainsi calculé, l'azote aminé dépasse largement ce qu'on pouvait estimer a priori. En effet les auteurs concluent que l'azote aminé constitue non plus 40 mais 90 % de l'azote total, et ce chiffre leur permet d'établir un bilan azoté complet dans les vins examinés.

Jamais une teneur aussi élevée n'avait été signalée en ce qui concerne l'azote aminé des vins. Cette correction apporterait-elle le même bouleversement dans le bilan azoté de tous les vins ? Les méthodes chromatographiques de dosages ne sont le plus souvent ni assez précises ni assez générales pour donner le taux exact de tous les acides aminés présents. Nous avons fait personnellement ce calcul de l'azote aminé des acides aminés dosés dans nos échantillons. Même en tenant compte de son caractère approximatif (certaines taches caractérisées sur les chromatogrammes n'ayant pu être évaluées que de façon approchée), nous sommes très en deçà des proportions d'azote aminé avancées par BOURDET et HERARD.

LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (40) ont publié en 1959 des résultats très complets de dosages microbiologiques des acides aminés des moûts et des vins. La comparaison de l'azote aminé évalué par

formol-titration et de l'azote aminé des acides aminés dosés par voie microbiologique met également en évidence la disparité des résultats dans les deux méthodes. Mais ces auteurs donnent de l'écart constaté entre les évaluations d'azote aminé une tout autre explication : ils supposent que les microorganismes utilisés sont capables d'attaquer les petits polypeptides. Ce serait donc la méthode microbiologique qui donnerait des chiffres un peu trop élevés. Ils en donnent pour preuve le fait que c'est dans les vins blancs que les différences constatées sont les plus grandes : or les vins blancs sucrés sont ceux qui d'après RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (74) ont subi l'action bactérienne la moins intense (sans doute à cause de la pratique courante du sulfitage) ; n'ayant pas subi de protéolyse bactérienne, ils possèderaient encore des polypeptides assimilables.

Si les problèmes relatifs à l'azote des vins sont peut-être encore loin d'être résolus, l'étude individuelle des acides aminés dans le vin n'en prend à notre avis que plus d'intérêt. C'est l'étude que nous nous étions proposée en abordant ce travail. Nos résultats nous ont appris et ceux des autres auteurs nous ont confirmé que les taux relativement faibles d'acides aminés dans les vins ne sauraient constituer un appoint valable à la ration alimentaire (J.A. GAUTIER) (29). En revanche, le rôle des acides aminés est essentiel en oenologie ; ils sont à la base de l'assimilation azotée des levures et des bactéries ; de plus par dégradation (réaction d'Ehrlich) ils conduisent aux acides et aux alcools ; aussi a-t-on pensé en faire les responsables du "bouquet" des vins. Le rôle prépondérant des acides aminés dans les processus de la fermentation alcoolique a légitimé la seconde partie de notre travail : l'étude de l'évolution des acides aminés du moût au vin.

Les auteurs qui ont comparé les vins et les moûts, ou bien ont analysé un grand nombre d'échantillons, mais n'ont pu le faire sur des vins et des moûts correspondants, ou bien ont suivi pas à pas les stades de la fermentation, mais avec un nombre évidemment

limité d'échantillons. Les méthodes employées sont longues et délicates et pour que la comparaison soit valable, on ne peut se permettre d'étaler les analyses quand il s'agit d'une matière biologique en évolution comme le vin.

Nous avons préféré retenir un nombre restreint de moûts et faire une étude en quelque sorte "longitudinale" de l'évolution des acides aminés dans les transformations que ces moûts sont appelés à subir pour devenir des produits de consommation (jus de raisin, vin blanc, vin rouge...) ; aussi sommes-nous dès le départ consciente des limites qui nous seront imposées dans nos conclusions.

Nous avons adopté dans notre travail le plan suivant :

CHAPITRE I : Méthode de recherche des acides aminés par Chromatographie, et application au vin.

1) Travaux antérieurs
2) Travaux personnels
   A) séparation des acides aminés
   B) chromatographie sur papier
3) Confrontation des résultats

CHAPITRE II : Recherche des acides aminés et estimation approchée de leur taux ; application au jus de raisin.

1) Mise au point bibliographique
2) Adaptation de la technique personnelle aux déterminations quantitatives
3) Résultats dans une série de jus commerciaux

CHAPITRE III: Dosage des acides aminés dans le moût de raisin et ses produits de transformation

1) Préparation des échantillons
2) Etude critique des méthodes de dosage
3) Choix d'une technique opératoire
   A) méthodes essayées
   B) technique adoptée

CHAPITRE IV : Aperçu sur l'évolution des taux d'acides aminés au cours de diverses transformations du moût.

1) Dosages chimiques

2) Analyses chromatographiques

3) Examen des résultats et comparaison avec les données bibliographiques
   A) dans les moûts
   B) dans les jus de mixer
   C) dans les jus conservés

CHAPITRE V : Evolution du taux des acides aminés au cours de la vinification

1) Dosages chimiques

2) Analyses chromatographiques et examen des résultats personnels
   A) dans les vins normaux
   B) dans les vins expérimentaux

3) Comparaison des résultats avec les données bibliographiques

4) Les transformations du moût au vin : influence de la fermentation :
   a) dans les vins normaux
   b) dans les vins spéciaux

5) Observation relative aux techniques :
   Comparaison des dosages chromatographiques et microbiologiques d'acides aminés dans les vins.

CONCLUSIONS

L'examen de ce plan met en relief des anomalies apparentes qui trouvent leur explication dans des circonstances contingentes, parfois fâcheuses, indépendantes de notre volonté : notre travail, interrompu à deux reprises pour raison de santé, s'est échelonné sur une période anormalement longue. Les méthodes initiales laborieusement mises au point, ont été, en conséquence, remplacées en cours de recherches, par des procédés plus nouveaux, bénéficiant des progrès récents de la technique, notamment en matière de chromatographie, et il n'a pas toujours été possible de reprendre par le debut les expériences initiales selon les modalités nouvelles ; ainsi l'identification qualitative des aminoacides dans les vins

et leur estimation quantitative ultérieure dans les jus de raisins, font-elles appel à des modes opératoires chromatographiques un peu différents . Enfin il s'est révélé parfois impossible, dans l'étude des variations des constituants des moûts, liées à leurs diverses transformations de retrouver exactement les échantillons naturels de départ, ce qui a malencontreusement réduit le nombre des individus soumis à l'expérimentation.

En dépit de ces lacunes, il nous semble que notre travail est susceptible d'apporter certaines précisions dans les différents domaines concernant la composition des vins et la transformation des jus naturels. En particulier nous nous sommes attachée à comparer, en fonction des techniques adoptées, les résultats, souvent peu en accord, des différents auteurs.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Chimie Organique de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Avant d'en exposer la matière et les résultats, nous tenons à exprimer notre gratitude profonde à notre Maître, Monsieur le Professeur J.A. GAUTIER qui a suscité et dirigé nos recherches et qui nous fait aujourd'hui l'honneur de présider notre jury de thèse. Dix années de travail sous sa direction, comme Interne des Hôpitaux Psychiatriques, puis comme Attachée au Centre National de la Recherche Scientifique, nous ont profondément marquée tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel. S'il nous a initiee aux méthodes et techniques de la Recherche, le Professeur J.A. GAUTIER a su aussi nous montrer l'importance des idées, le pouvoir des mots et de la culture dans le travail de laboratoire comme dans la vie. Par ses brillantes qualités d'humaniste et de chercheur, il a su créer dans son équipe de travail, une ambiance affective d'une qualité inappréciable. Il représente pour nous le modèle même du "patron".

De ses éminentes qualités, nous avons quotidiennement bénéficié pendant plusieurs années durant notre internant et pendant l'élaboration de notre thèse. Notre travail, contrarié ou entravé à plusieurs reprises par des difficultés techniques jointes aux péripéties de la vie familiale, n'aurait pu être conduit à bien sans le constant soutien, la compréhension et les conseils de Monsieur le Professeur J.A. GAUTIER. C'est pour nous un honneur et une joie de lui exprimer ici notre respectueuse reconnaissance, notre admiration et notre affection.

Nous exprimons notre respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur P. MALANGEAU qui a accepté de juger ce travail.

Monsieur A. MANGEOT Maître de Conférences, a bien voulu faire partie de notre jury. Nous le prions de croire à notre sincère reconnaissance.

Monsieur L. GENEVOIS Professeur à la Faculté des Sciences de Bordeaux, a bien voulu assurer notre parrainage scientifique. Il nous a prodigué ses conseils éclairés et ses encouragements. Nous lui exprimons notre profonde reconnaissance.

Monsieur P. DUPAIGNE, Chef de laboratoire à l'Institut Français des Recherches Fruitières Outre-Mer, a mis à notre disposition des produits originaux et son expérimentation. Il nous a apporté des suggestions et des conseils qui nous ont beaucoup aidée. Nous tenons à lui en rendre témoignage et nous lui exprimons notre reconnaissance pour le concours qu'il nous a apporté dans l'élaboration de ce travail.

Au cours de nos recherches au laboratoire, nous avons à plusieurs reprises bénéficié des suggestions et des conseils de Monsieur le Professeur J. RENAULT, de Monsieur M. MIOCQUE, Maître de Conférences et de Monsieur F. PELLERIN, chef de Travaux Pratiques. Nous leur exprimons notre gratitude.

Enfin nos remerciements vont encore à nos collègues du laboratoire. Par leur gentillesse, leur sympathie et l'intérêt direct ou indirect porté à nos travaux, ils nous ont apporté une aide précieuse. Nous leur exprimons notre reconnaissance et notre amitié.

CHAPITRE I

-:-

METHODE DE RECHERCHE DES ACIDES AMINES PAR CHROMATOGRAPHIE ET APPLICATION AU VIN

-:-

Comme il a été signalé plus haut la méthode chromatographique apparaissait avantageuse pour la recherche individuelle des acides aminés ; elle avait été d'ailleurs appliquée depuis peu d'années par divers auteurs dont nous résumons tout d'abord les recherches.

1) Travaux antérieurs : (Tableau IV)

SISAKYAN et BEZINGER (77 et 78) ont été les premiers en 1949 et 1950 à rechercher les acides aminés libres dans les vins en appliquant la méthode de chromatographie sur papier. Ils ont caractérisé dans les vins cachetés de Géorgie, en forte quantité : proline, alanine, acide glutamique, valine en faible quantité : acide aspartique, sérine thréonine et à l'état de traces, sans doute la phénylalanine.

VALAIZE et DUPONT (85) se sont intéressés à la relation entre la composition des moûts en acides aminés et le "bouquet" des vins. Par chromatographie ils ont caractérisé dans les moûts en 1951 six acides aminés dont la tyrosine et la leucine (ou l'isoleucine). En appliquant la chromatographie bidimensionnelle à quelques moûts en 1953, DUPONT (26) retrouve dans tous les acides aminés déjà cités, et dans quelques-uns seulement, le glycocolle et la thréonine.

C'est dans le but d'étudier la fermentation malo-lactique que LUTHI et VETSCH (44) déterminent la composition des vins rouges et blancs en acides aminés en 1952 et 1953. Ils révèlent sur leurs chromatogrammes, outre les acides aminés identifiés par les auteurs précédents l'histidine et l'arginine irrégulièrement présentes, l'acide γ amino butyrique toujours positif. De plus par comparaison avec des échelles d'acides aminés témoins, ils donnent une évaluation approximative de six acides aminés presque toujours présents dans le vin (voir Tableau XX, Ch.V).

Ajoutons à ces données le travail très important de CASTOR en 1953 (19) qui n'emprunte pas la modalité chromatographique ; par voie microbiologique, il dose quatorze acides aminés dans les moûts et suit leur évolution du moût au vin. Au cours de la fermentation alcoolique, les acides aminés du moût paraissent largement consommés par la levure ; cependant pour quelques-uns d'entre eux, leur taux remonte quand les levures cessent de se multiplier. Si l'on excepte la proline et l'alanine dont l'auteur ne fait pas mention, et quatre acides aminés présents à l'état de traces (lysine, méthionine, cystine, glycocolle) tous les autres atteignent des taux élevés dans les moûts ; l'arginine peut même dépasser 1 g par litre. Enfin la méthode microbiologique permet à l'auteur de séparer l'isoleucine de la leucine et de doser le tryptophane.

2) Travaux personnels

En 1954 une quinzaine d'acides aminés avaient donc été identifiés tant dans les moûts (par VALAIZE et DUPONT et par CASTOR) que dans les vins (vins suisses par LUTHI et VETSCH, vins russes par SISAKYAN et BEZINGER). Nous nous sommes demandée si nous retrouverions ces acides aminés dans les vins français de grande consommation et quels en seraient les taux. De tels vins ont l'intérêt d'une composition assez fixe par une sorte de régulation statistique du fait des coupages systématiques, ce qui correspondait à notre double but de résoudre le cas difficile des vins très

chargés en colorant et d'apprécier l'appoint en acides aminés que doit au vin l'alimentation courante du français moyen.

C'est pourquoi nous nous sommes préoccupée sous la direction de Monsieur le Professeur J.A. GAUTIER en 1954 de mettre au point une technique propre à l'identification des acides aminés libres du vin, technique qui a été exposée devant la Société de Chimie Biologique (30).

La chromatographie sur papier s'est révélée une méthode de choix à condition de l'appliquer à des solutions débarrassées d'impuretés. Les chromatogrammes préparés directement avec le vin non traité sont tout à fait illisibles.

A) Séparation des acides aminés

Dans le cas des vins les substances interférentes sont surtout les colorants naturels (les vins rouges commerciaux que nous avons analysés étaient particulièrement colorés) et les sels minéraux ; dans le cas des moûts et des vins doux, les sucres doivent être aussi éliminés avant la chromatographie. La préparation de la solution chromatographique a été tentée selon diverses modalités:

1°- Défécation

L'emploi des sels de métaux lourds ne résoud pas le problème du dessalage, bien au contraire, et est insuffisant pour l'élimination complète des matières colorantes.

VALAIZE et DUPONT éliminaient les sucres en les oxydant par un mélange de sulfate de cuivre et de baryte. Ils ont par la suite abandonné cette technique qui pouvait entraîner des pertes d'acides aminés.

2°- Adsorption des acides aminés sur charbon

Le passage du vin sur du charbon "ACTIVIT" permettait d'obtenir une liqueur très faiblement colorée ; mais des essais nous ont montré que les acides aromatiques étaient adsorbés sur la co-

lonne en même temps que les matières colorantes et ne pouvaient en être séparés par élution.

3°- Déminéralisation sur échangeurs d'ions

C'est ce procédé que nous avons finalement retenu ; nous avons suivi la technique préconisée par PARTRIDGE et coll. (61). La Permutite 50 est un échangeur de cations de type polystyrène sulfoné et de capacité théorique 1,2 méq./ml de résine humide. BOULANGER et BIZERTE (12) qui l'ont employée en 1951 pour isoler les acides aminés du plasma sanguin résument ainsi son comportement : "tous les acides aminés sont fixés et peuvent être quantitativement déplacés par l'ammoniaque diluée ; dans ces conditions les cations minéraux ne sont pas élués".

Préparation de la colonne et son emploi pour la séparation des acides aminés du vin :

On ne doit retenir que les grains de résine passant entre les tamis 25 et 50 (0,4 à 0,8 mm de diamètre). La résine est préalablement mise à "gonfler" au contact d'un grand volume d'eau puis lavée à trois reprises, alternativement par HCl 5N et l'eau distillée.

Nous versons la résine humide dans une colonne de verre de 16 à 20 mm de diamètre sur une hauteur d'environ 15 cm. L'activation (ou la régénération) est obtenue en faisant passer goutte à goutte sur la colonne un litre d'acide chlorhydrique 2N. La résine sous sa forme "acide" est enfin lavée par trois à six litres d'eau distillée.

Une fraction aliquote de vin généralement, 50 ml, (ce qui correspond à moins d'un méq. d'N aminé pour une colonne d'une capacité théorique de 15 méq. d'N) est alors versée sur la Permutite, puis on lave avec 200-300 ml d'eau. Les sucres et la plus grande partie des colorants passent dans le filtrat et les eaux de lavage. Les sels minéraux et les acides aminés sont adsorbés sur la

résine ; on élue électivement ces derniers par l'ammoniaque N. Il faut prendre la précaution de déterminer avant usage la capacité de la colonne en ammoniaque N ou de recueillir l'éluat par petites fractions jusqu'à apparition de l'ammoniaque en bas de la colonne (virage du papier à la phénolphtaléine) car la fraction précédant immédiatement l'arrivée de l'ammoniaque contient déjà des acides aminés. L'effluent est jaunâtre dans le cas des vins rouges sans doute des traces des colorants sont-elles adsorbées et éluées en même temps que les acides aminés.

Les 200 à 300 ml recueillis sont concentrés par distillation sous pression réduite à température $< 35°$. Le petit volume de liquide restant dans le ballon est évaporé en exsiccateur sous vide en présence de soude. Le résidu sec est repris par un petit volume d'eau (généralement 5 ml pour 50 de départ) et soumis à la chromatographie sur papier.

B) Chromatographie sur papier

Nous avons appliqué les techniques de la chromatographie descendante mises au point par CONSDEN, GORDON et MARTIN en 1944 (23). Les détails opératoires ont été empruntés aux ouvrages classiques sur cette méthode : LEDERER 1943 (42), BOULANGER et BISERTE 1950 (11), BLOCK et coll. 1952 (10), MACHEBOEUF 1953 (45).

Nous avons utilisé le papier Whatman n°I et les solvants suivants :

1) mélange de Partridge : n-butanol/acide acétique/eau , 4:I:5. Le butanol a été redistillé au laboratoire avant l'emploi : le mélange doit être préparé à la température de la chambre de développement ; la couche aqueuse sert à saturer la cuve tandis que la phase organique est celle du développement.

2) phénol saturé d'eau ; nous préparons une solution stock (phénol crist. 900 g + eau distillée 100 g) et nous l'agitons avec un excès d'eau distillée.

La séparation théorique des acides aminés dans le phénol est satisfaisante surtout pour les acides aminés à bas R_f qui sont trop voisins dans le butanol. Mais les chromatogrammes développés en phénol présentent toujours une bande brune plus ou moins importante au front du solvant. Nous obtenons des résultats très améliorés en distillant le phénol en présence de tournure d'aluminium et de $NaHCO_3$ selon DRAPER et POLLARD (25). Le phénol tamponné (phénol + tampon phosphate pH 12,0 selon BLOCK) nous a permis d'obtenir une meilleure séparation : les taches sont moins allongées que dans le phénol-eau.

Des prises d'essai de 10 à 50 µl ont été déposées sur le papier avec une micropipette.

Nous avons préparé des solutions d'acides aminés témoins à 1‰ et adopté la technique des témoins externes et des témoins internes ; nous développons côte à côte l'acide aminé témoin, l'échantillon de vin à analyser, et le même échantillon chargé de l'acide aminé témoin (voir Fig.1).

Les chromatogrammes développés, sont séchés à 100° et enfin révélés à la ninhydrine à 0,1 % dans le butanol acétique. Pour la proline peu sensible à la ninhydrine nous avons préféré un révélateur spécifique : l'isatine préconisée par ACHER et coll.(1).

3) Confrontation des résultats :

Nous rappelons que nous avons travaillé sur un vin rouge de grande consommation (ce type de vin presentant une certaine fixité de composition). Nous avons identifié avec certitude dans ce vin neuf acides aminés : cystine, acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycocolle, alanine, valine, proline, leucine. Nous concluons positivement lorsque l'acide aminé témoin en surcharge dans l'échantillon de vin et la tache à identifier dans ce vin, apparaissent sur le même front, dans les deux séries de solvants (Fig.1).

Cependant la proline et la leucine sont difficiles à caractériser en phénol à cause de leur R_f très élevé ; la proline est identifiée de façon certaine en butanol par ses colorations spécifiques : jaune (et non pas mauve comme les autres acides aminés) avec la ninhydrine ; bleue avec l'isatine (seule l'hydroxyproline dont le R_f est nettement plus bas, donne les mêmes colorations). La proline est de beaucoup l'acide amine le plus largement représenté sur nos chromatogrammes.

Pour séparer de façon satisfaisante en butanol : acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycocolle dont les R_f sont trop voisins, nous avons dû développer les chromatogrammes pendant 48 heures et même plus (Fig.2).

Nous avions pensé qu'une tache très voisine de la leucine était susceptible de caractériser l'isoleucine ; nous avons constaté par la suite qu'il était presque impossible de séparer leucine et isoleucine par chromatographie ; il s'agissait en fait de la phénylalanine.

Le tryptophane s'est manifesté de façon inconstante ; cette déficience est sans doute due à la technique employée.

Enfin il restait sur nos chromatogrammes plusieurs spots que nous n'avons pas réussi à identifier en chromatographie unidimensionnelle.

Nos résultats (30) de même que ceux des auteurs précédents sont qualitativement résumés dans le tableau ci-joint : (Tableau IV)

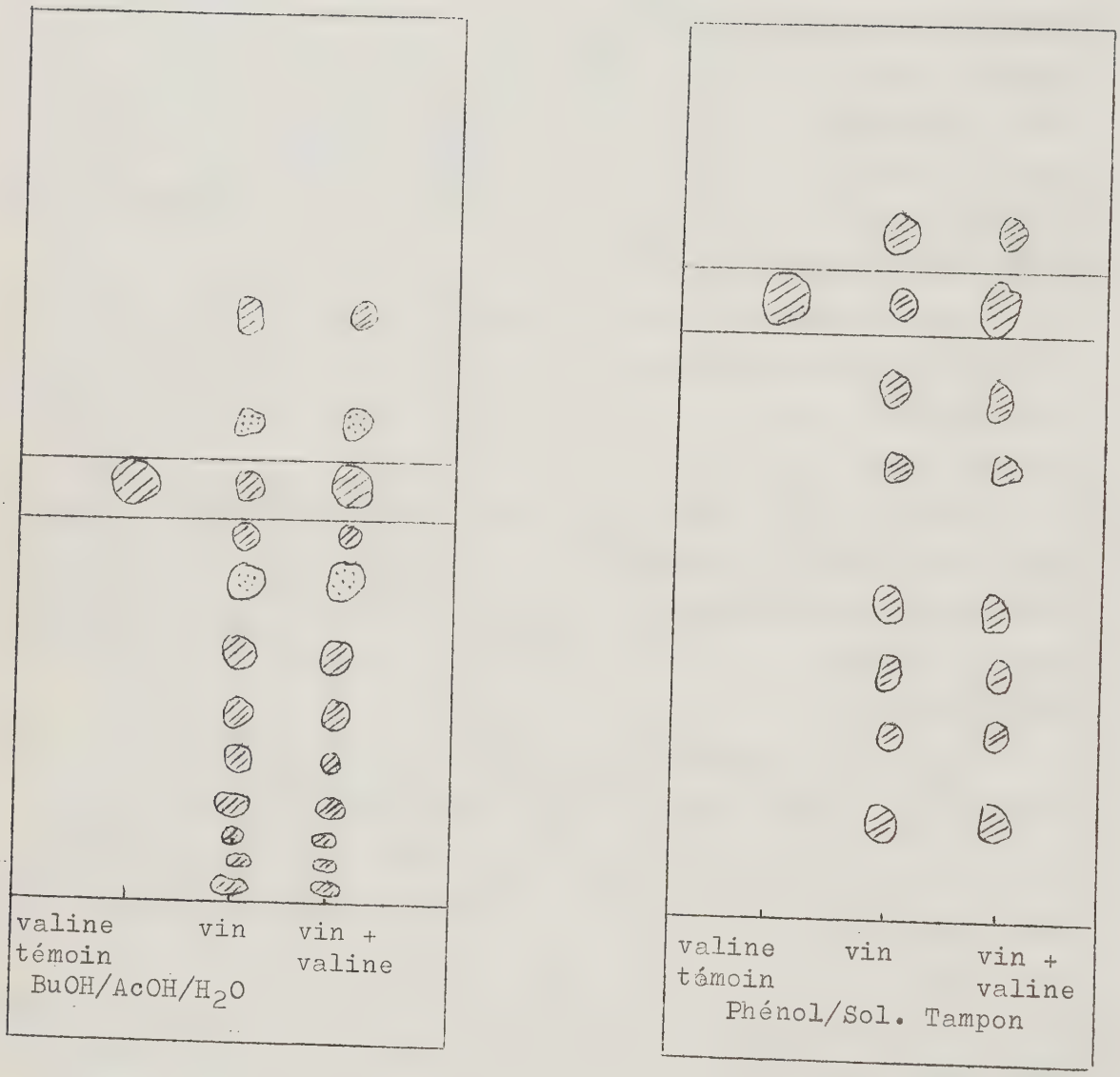
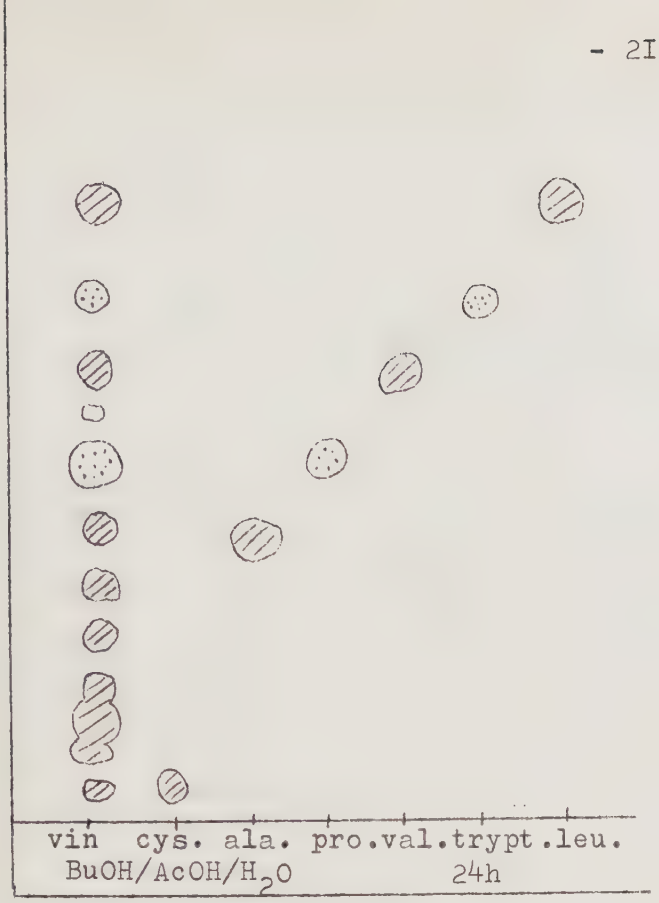
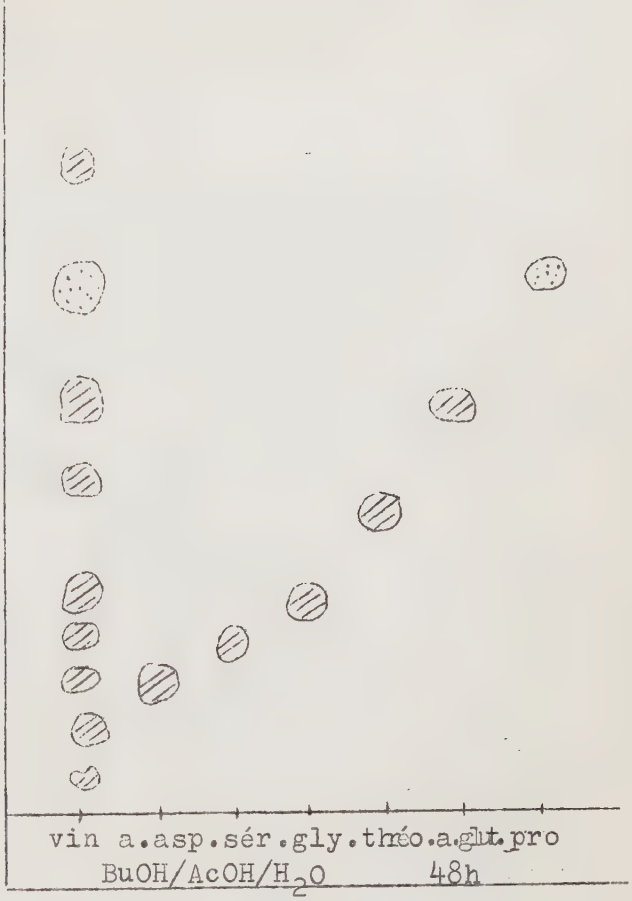


Fig. I : Chromatogrammes unidimensionnels des acides aminés du vin avec témoin externe et interne





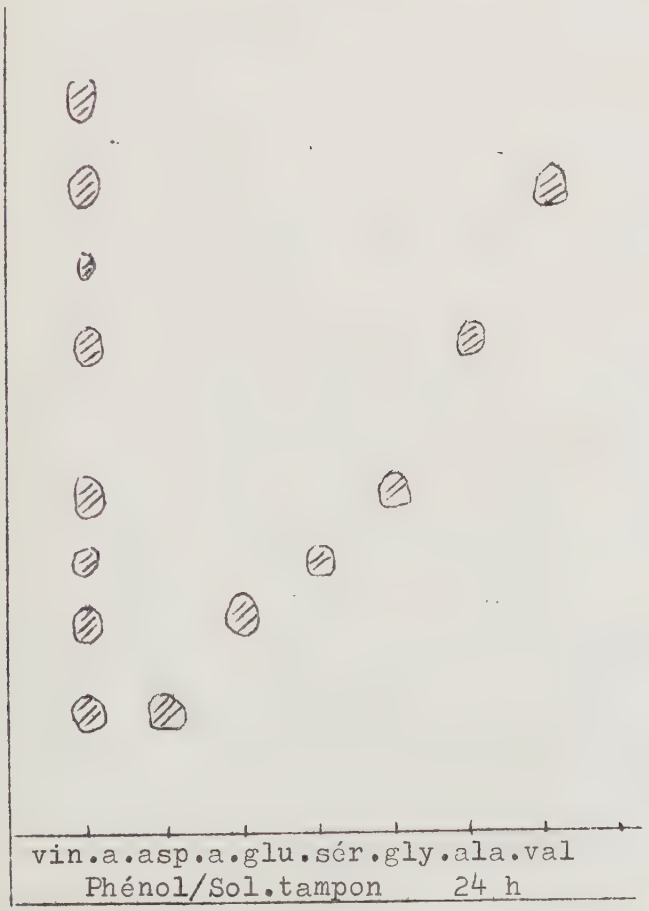


Fig. 2 : Chromatogrammes unidimensionnels des acides aminés du vin (24 et 48 heures)

Tableau IV

Amino-acides libres caractérisés dans les moûts et les vins jusqu'en 1954

	Sisakyan et Bezinger U.R.S.S. 1949-50 (77 et 78) Vins Chromatographie	Valaize et Dupont France 1951-53 (85) Moûts Chromato.	Luthi et Vetsch Suisse 1952-53 (44) Vins Chromato.	Castor U.S.A. 1953 (19) Moûts Microb.	J.A.Gautie et J.Guéné 1954 (30) Vins Chromato.
α alanine	+	+	+		+
acide γamino-butyrique			+		
arginine			+	+	
acide aspartique	+	+	+	+	+
cystine				+	+
acide glutamique	+	+	+	+	+
glycocolle		+	+	+	+
histidine			+	+	
isoleucine		+		+	
leucine			+	+	+
lysine				+	
méthionine				+	
phénylalanine	?	+	+	+	
proline	+	+	+		+
sérine	+	+	+		+
thréonine	+	+	+		
tryptophane				+	?
tyrosine		+	+	+	
valine	+	+	+	+	+

On retrouve dans le vin examiné pratiquement les mêmes acides aminés que dans les vins déjà étudiés par les précédents auteurs. Cependant nous n'avons pas identifié les acides aminés basiques trouvés par LUTHI et VETSCH dans les vins suisses. Peut-être existent-ils à des taux très faibles ; nous n'avons pas pu réduire de plus de dix fois le volume liquide initial à cause de la trop forte prédominance de la proline.

Par contre dans notre échantillon de vin nous avons révélé deux acides aminés qui n'étaient connus jusque-là que dans les moûts (CASTOR) : la cystine et le tryptophane (ce dernier irrégulier mais facile à identifier par la coloration jaune-brun qu'il donne avec la ninhydrine).Le procédé analytique employé ne permet pas le dosage de l'acide aminé identifié ; on peut cependant se faire une idée de son ordre de grandeur en comparant la dimension et l'intensité de la tache avec celle des témoins développés en même temps et préparés à partir d'une solution de concentration connue.

Seule la proline est particulièrement abondante dans le vin analysé. Nous avons estimé que son taux devait être supérieur à 300 mg par litre ; les autres amino-acides qui donnent cependant une tache bien visible n'atteignent pas 50 mg.

Nous pouvons d'ores et déjà formuler la conclusion suivante : les acides aminés sont sans doute bien representés dans le vin mais, pour la plupart à des taux très faibles, certainement pas supérieurs à leurs taux dans les autres aliments. Le vin ne saurait donc constituer pour les acides aminés qu'une source de second ordre dans la ration alimentaire quotidienne.

Si les estimations de LUTHI et VETSCH sont du même ordre que les nôtres, les taux des quatorze acides aminés dosés par CASTOR sont nettement plus élevés. Nous devons remarquer que cet auteur a utilisé la voie microbiologique et qu'il a étudié non pas les vins mais les moûts au départ de la fermentation alcoolique. Or ses travaux mettent en évidence la participation des acides aminés

aux processus fermentaires. Il semble donc probable que les moûts soient plus riches que les vins en azote aminé. Nous avons pensé qu'il serait intéressant de comparer le jus de raisin et le vin au point de vue de leur teneur en acides aminés avec l'espoir d'en tirer quelques conclusions sur le rôle collectif et individuel joué par ces métabolites pendant la fermentation alcoolique. Pour cela il nous fallait :

- vérifier si notre technique d'identification des acides aminés était applicable au matériel quelque peu différent du vin qu'est le jus de raisin.

- améliorer la méthode adoptée dans le sens d'une augmentation de son pouvoir de discrimination (identification des spots inconnus) et d'une estimation plus précise du taux des acides aminés présents.

Ces préoccupations font l'objet du chapitre suivant.

-:-

CHAPITRE II

-:-

RECHERCHE DES ACIDES AMINES ET ESTIMATION APPROCHEE DE LEUR TAUX - APPLICATION AUX JUS DE RAISIN

-:-

La méthode chromatographique sur papier, nous ayant permis d'identifier les acides aminés du vin, nous avons envisagé en 1957, de l'appliquer à une série de jus de raisin commerciaux. Notre but était, nous le rappelons, de comparer les vins et les moûts. Si nous avons analysé des jus de raisin et non des moûts frais, c'est qu'il est impossible de stocker ces moûts frais au-delà de quelques jours même à la température de 0°. Jus et moûts sont-ils équivalents ?.. Le jus de raisin commercial est un moût non fermenté qui a été filtré, et stabilisé, généralement par pasteurisation. En fait, pour la recherche des acides amines, nous pensons pouvoir assimiler jus et moûts vis-à-vis de notre méthode de travail ; en effet les moûts frais non fermentés que nous étudierons par la suite, seront eux aussi filtrés avant leur passage sur résine ; quant au chauffage nécessaire à la pasteurisation, nous verrons au chapitre IV qu'il n'affecte pas la composition en acides aminés.

Il se peut que le matériel auquel s'adressent les auteurs qui ont préféré la voie microbiologique, soit sensiblement différent du nôtre. CASTOR indique par exemple qu'il convient d'agiter le moût à doser avant le prélèvement pour redissoudre ou "remettre en suspension" les substances qui se sont déposées à basse température (+). Nous aurons plusieurs fois l'occasion de souligner les

---

(+)"The must samples were brought to room temperature and shaken to suspend or redissolve any substances precipitated in cold storage" (19).

divergences qui existent entre les méthodes de dosage chromatographique et microbiologique.

Avant d'exposer notre technique et nos résultats, nous nous proposons de rappeler brièvement les travaux publiés depuis 1953 et concernant les matières azotées ou plus spécialement les acides aminés du raisin que ce soit dans le moût le jus ou le vin.

1) Mise au point bibliographique :

La dynamique de l'azote dans le raisin a été étudiée dès 1939 par PEYNAUD (66). Au cours de la maturation, le raisin perd son azote minéral et s'enrichit en azote organique. On peut représenter les variations des formes azotées depuis le raisin jusqu'au vin par le schéma ci-dessous :

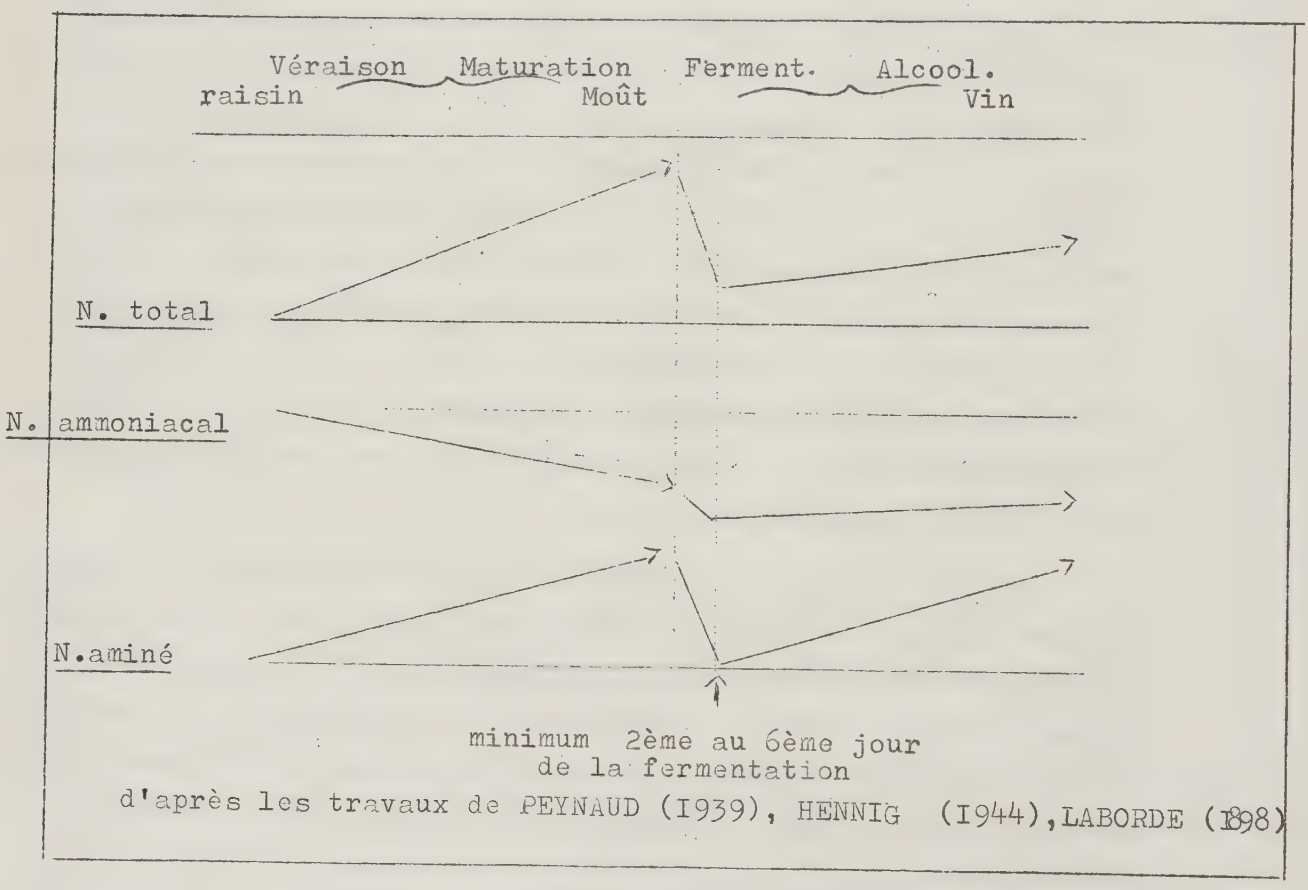


Fig. 3 : Evolution des formes azotées du raisin au vin

Les conclusions des travaux beaucoup plus récents de GERASIMOVA et DIKHTYAR (1953) (33) confirment celles de PEYNAUD : N. total, N. protéique, N. aminé augmentent très sensiblement pendant la maturation du raisin. Dès que le sucre dépasse la concentration de 9 % il est possible aux auteurs de caractériser sur les chromatogrammes une dizaine d'acides aminés. Par la suite la composition qualitative ne change plus, mais le taux de ces acides aminés croît pour atteindre son maximum à la maturité.

Nous avons résumé au chapitre précédent les travaux de VALAIZE et DUPONT en France (26 et 85) qui ont abouti à l'identification d'une dizaine d'acides aminés dans des moûts de raisin, et ceux de CASTOR (19) sur les dosages microbiologiques d'amino-acides dans des moûts de Californie. En 1956 CASTOR et ARCHER (20) en associant les méthodes chromatographique et microbiologique ont trouvé que les acides aminés les plus abondants dans le moût étudié étaient les suivants : proline, sérine, thréonine, (non cités dans la publication antérieure) arginine et acide glutamique. Si la proline reste inchangée pendant la fermentation, certains autres comme arginine et thréonine, diminuent pendant le même temps de 75 et même 90 %.

LUTHI et VETSCH (44) ont évalué, nous l'avons vu, le taux de quelques acides aminés dans les vins; ces auteurs ont également appliqué leur technique à deux moûts de raisin : Raüschling et Riesling-Sylvaner ; acide glutamique et alanine seraient les plus abondants des acides aminés présents.

SISAKYAN et divers coll. ont poursuivi leurs travaux sur les substances azotées du vin. En 1953, (79) ils étudient le sort des acides aminés et des peptides pendant les premiers stades de la fermentation puis pendant la formation et le vieillissement du vin. Excepté la proline, les acides aminés sont tous utilisés par la levure durant les cinq ou six premiers jours de la fermentation ; les peptides diminuent en même temps, hydrolysés sans doute par les peptidases des levures. Puis à mesure que la fermentation

avance, les uns et les autres réapparaissent sur les chromatogrammes. La proline qui reste inchangée pendant les processus de la fermentation diminue considérablement lors du vieillissement du vin.

Ces conclusions, au moins dans leurs grandes lignes, sont en accord avec celles de CASTOR. Elles vont dans le même sens aussi que celles des dosages de l'azote aminé dans le moût en fermentation, effectués par HENNIG en 1944 (34) et par LABORDE dès 1898 (cité par GENEVOIS et RIBEREAU-GAYON (32)) et dont nous avons schématisé la ligne générale dans la figure 3.

Au Japon en 1954, ASO et coll. (4) ont analysé par chromatographie quatre jus de raisin frais et comparé leurs résultats à ceux de LUTHI et VETSCH. Ils ont reconnu dix-sept acides aminés dont la glutamine ; trois autres n'ont pu être identifiés.

De 1954 à 1957, nous trouvons encore dans la littérature les noms de plusieurs auteurs étrangers dont les travaux s'attachent plus particulièrement à la recherche chromatographique des acides aminés dans le vin.

HENNIG et FLINTJE (35) ont identifié dix-sept acides aminés dans les vins allemands en 1954. Ils donnent une place importante aux acides aminés basiques. Il ressort de leurs travaux que les moûts sont moins riches que les vins en acides aminés ; ce serait alors la levure qui apporterait au vin ses acides aminés ; les auteurs font d'ailleurs remarquer que les acides aminés des protéines de la levure sont les mêmes que ceux caractérisés dans le vin.

Au Portugal en 1954 ALMEIDA (2) a étudié le vin de Porto ; il ne fait pas mention des acides aminés libres, mais identifie par chromatographie ceux provenant de l'hydrolyse des protéines qui forment le dépôt de ce vin.

Les acides aminés des vins italiens ont été recherchés par plusieurs auteurs qui ont tous eu recours à la méthode chromatographique ; en 1954 TARANTOLA (81) identifie à côté des acides aminés classiques : histamine, cystine et asparagine ; la même année

PROCOPIO et CALE (72) ne retrouvent pas dans les vins les acides aromatiques fréquemment signalés par les auteurs ; ils caractérisent la Balanine dans quelques vins rouges ; en 1957 COLAGRANDE (22) analyse des moûts et des vins, blancs et rouges ; pour lui les acides aminés sont abondants dans le moût, mais beaucoup plus faibles dans le vin.

DIMOTAKIS (1955) (24) retrouve dans les vins grecs les acides aminés déjà vus chez les auteurs précédents ; mais il semble qu'il soit le premier à signaler la présence de norvaline.

En 1956 CARBALLO (16) soumet à la chromatographie sur papier, divers types de vins espagnols et les jus frais de plusieurs variétés de fruits. Dans les peaux qui ont été séparées des pulpes au moment de la préparation du jus de muscat, l'auteur retrouve des quantités considérables d'acides aminés.

Nous avons encore eu connaissance en 1957 des travaux de PRILLINGER (71) en Autriche pour qui glycocolle, valine, acide γ aminobutyrique sont toujours abondants dans le vin ; l'auteur identifie la lanthionine dans quelques vins jeunes.

Nous ne pouvons nous étendre davantage sur les conclusions de tous ces travaux. BIDAN et ANDRE (5) en ont fait en 1958 une revue minutieuse en les étudiant, et par auteurs, par ordre chronologique, et par acides aminés. Nous donnerons seulement sous forme de tableau (tableau V) la liste des acides aminés identifiés, en faisant les deux remarques suivantes :

- il convient d'y adjoindre les résultats antérieurs à 1954 qui ont fait l'objet du tableau IV

- pour compléter cette revue, nous mentionnerons également dans le tableau les conclusions de deux publications postérieures (1958) parce qu'elles ont trait toutes les deux à la recherche qualitative des acides aminés dans le vin.

	Luthi & Vetsch (Suisse) 1953 jus de raisin	Aso & Col. (Japon) 1954 jus raisin	Almeida (Portugal) 1954 vins	Hennig & Flintje (Allemagne) 1954 vins	Procopio et Cale (Italie) 1954 vins	Tarantola (Italie) 1954 vins	Dimotakis (Grèce) 1955 vins	Carballo Caabeiro (Espagne) 1956 vins et moûts	Colagrande (Italie) 1957 vins & moûts	Prillinger (Autriche) 1957 vins	Markh et Shcherbakova (URSS) 1958 vins	Peltonen & Coll. (Finlande) 1958
α alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β alanine		+			+				+			
acide α aminobutyrique		+									+	
acide γ aminobutyrique	+	+		+	+	+	+	+	+	+		+
arginine	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	
asparagine		+				+			+	+		
acide aspartique	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
cystéine								?	+	+	+	
cystine						+	+			+	+	
glutamine		+								?		
ac.glutam.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glycocolle	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
histamine						+						
histidine		+		+		+	+	+	+	?	+	
isoleucine				+	+	+		+			+	+
leucine		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
lanthionine										+		
lysine		+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	
méthionine			+	+			+	+	+	+	+	+
méth.sulfon									+			
méth.sulfoxyde									+			
norvaline							+					
ornithine						+			+			
phénylalanine		+	+	+				+	+	+	+	+
acide pipécolique												
oxyproline							+		+			
proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sérine	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
thréonine	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+
tryptophane		+	+				+					
tyrosine			+	+		+		+	+	+	+	+
valine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau V : Acides aminés libres identifiés qualitativement dans le raisin et ses produits de transformation.

2) Adaptation de la technique personnelle aux déterminations quantitatives :

Nous avons appliqué la technique en deux temps précédemment décrite pour les vins. Grâce à la chromatographie bidimensionnelle sur papier, nous avons pu compléter les résultats trop succincts du développement unidimensionnel, précédemment utilisé.

A) Séparation des acides aminés sur Permutite

Les jus, même dans le cas des jus de raisin rouges, sont beaucoup moins riches en colorant que le vin ordinaire que nous avions précédemment analysé ; aussi l'éluat recueilli à la sortie de la colonne, est-il pratiquement incolore. Mais les jus sont beaucoup plus chargés en sucres ; ces derniers ne sont pas adsorbés sur la Permutite, mais il faut éviter cependant de passer sur la résine des solutions trop concentrées ; c'est ainsi que dans le cas des jus 10, 11, 12 (jus concentrés) nous avons dû diluer les échantillons avant le passage sur colonne. Les mêmes opérations, que celles décrites pour la séparation des acides aminés du vin, ont été effectuées : passage de la prise d'essai sur Permutite régénérée, lavage à l'eau, élution à l'ammoniaque N, concentration de l'éluat ; enfin reprise de l'extrait sec par un petit volume d'eau (généralement 4 ml pour 20 ml de départ) en vue de la chromatographie sur papier.

B) Chromatographie sur papier

Nous avons eu recours à la chromatographie uni- et bidimensionnelle. Les réactifs et le papier utilisés étaient les mêmes ; le papier Arches 302 que nous avons eu l'occasion de comparer au Whatman n°I nous a donné des résultats aussi bons mais le développement est un peu plus lent. Le mélange de Partridge a été utilisé dans la première direction du développement et le phénol-eau dans la seconde ; tous les solvants ont été soigneusement distillés avant usage.

La chromatographie bidimensionnelle nous a permis de repérer la position d'acides aminés qui ne pouvaient être isolés sur nos précédents chromatogrammes : asparagine, acide γ aminobutyrique, glutamine, tyrosine (voir Fig.4).

Après les développements successifs de vingt-quatre heures dans les deux solvants, les taches des acides aminés de bas R_f dans le butanol, deviennent faciles à différencier. Méthionine et valine qui ont dans les deux solvants choisis, des R_f voisins, donnent sur le chromatogramme bidimensionnel des taches suffisamment décalées cependant pour ne pas être confondues. Ceux qui restent les plus délicats à séparer sont les acides aminés basiques ; leurs taches sont peu régulières ; l'histidine et l'arginine ne constituent pratiquement qu'une seule tache.

Les R_f que nous obtenons dans les conditions où nous opérons étant souvent sensiblement différents des R_f rapportés par la bibliographie, nous avons développé parallèlement aux chromatogrammes de jus à analyser, des chromatogrammes de témoins ; dans les cas douteux, nous avons encore utilisé la technique des témoins internes.

C) Estimation approximative du taux des acides aminés

Nous avons fait une estimation approximative du taux des acides aminés identifiés dans nos jus, en comparant la grandeur et la densité des taches obtenues après révélation à la ninhydrine, avec celles de témoins développés dans les mêmes conditions. Dans le cas de la proline, le révélateur était l'isatine. Nous préparons sur le même chromatogramme une gamme croissante de prises d'essai du jus à analyser, et une échelle de l'acide aminé à évaluer, dont la concentration est connue pour chacune des taches. Cette évaluation approchée (nous préférons cette expression à celle de "dosage semi-quantitatif", généralement admise par les auteurs) a été faite chaque fois que cela était possible sur des chromatogrammes unidimensionnels développés en butanol (leucine, phénylalanine, vali-

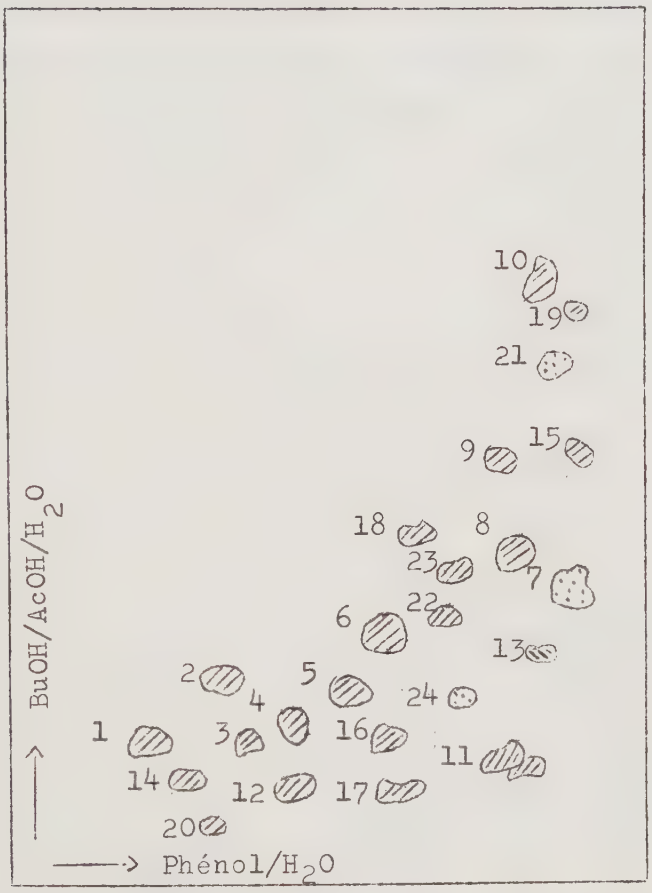


Fig. 4 : Chromatogramme bidimensionnel des acides aminés révélés.

1 acide aspartique
2 acide glutaminque
3 sérine
4 glycocolle
5 thréonine
6 alanine
7 proline
8 acide γ aminobutyrique
9 valine
10 leucine
11 arginine+histidine
12 asparagine
13 tache non indentifiée (X)
14 ornithine
15 acide pipécolique
16 glutamine
17 lysine
18 tyrosine
19 phénylalanine
20 cystine
21 tryptophane
22 βalanine
23 acide α aminobutyrique
24 oxyproline

ne, acide γ aminobutyrique, proline, alanine), parce que ce solvant s'est montré de beaucoup le plus "maniable". Les autres acides aminés ont été appréciés sur des chromatogrammes développés en phénol ou même sur des chromatogrammes bidimensionnels (mais dans ce cas nous ne pouvons préparer qu'une gamme limitée de témoins).

L'histidine et l'arginine mal séparées ont été estimées en arginine.

3) Résultats

Onze jus de raisin ont été analysés suivant la technique décrite ci-dessus ; leurs références sont consignées dans le tableau VI :

Tableau VI

Liste des jus de raisin analysés par chromatographie

N° des jus	Nature	Fabricant	Origine - Mode de préparation
I	Jus de raisin blanc	L'héritier-Guyot	Coupage de moûts du Midi et de Bourgogne
2	" "	Fournet	Jus désulfité du Gard
3	" "	Cavalès	Jus de Camargue conservé par pasteurisation
4	" rouge	Verger	Moût sulfité du Midi
5	" "	Challand	Coupage de Bourgogne et du Midi, sulfité
6	" "	Fournet	Moût sulfité de la région d'Aigues-Vives
7	" "	Fruidam	Moût sulfité du Midi
8	" "	Corbet	Moûts de la région de Dijon et du Midi
9	" "	Cavalès	Jus de la Camargue traité par pasteurisation
10	Jus blanc concentré	Foulon	Jus de raisin muté, évaporé au cinquième environ
11	Jus rouge concentré	Brun	Moût sulfité du Gard évaporé au cinquième

Il s'agit donc de quatre jus de raisin blancs et sept rouges, qui ont été pasteurisés, ou mutés, ou mutés et désulfités, ou encore concentrés, pour assurer leur conservation.

Les résultats sont figurés dans le tableau VII ; nous avons admis pour la signalisation adoptée, la quantification indiquée par la légende. Comme nous l'indiquons les résultats des jus 9, 10, 11, concernent les jus dilués tels que nous les avons passés sur la colonne ; ils sont à multiplier respectivement par 2, par 5, et par 5, pour être rapportés aux échantillons tels qu'ils nous ont été remis.

Neuf acides aminés sont présents dans tous les jus ; parmi eux, l'acide glutamique et l'α alanine sont les plus abondants.

La proline se retrouve dans tous les échantillons, mais à un taux beaucoup plus faible que dans le vin précédemment analysé. Elle n'apparaît pas régulièrement par révélation à la ninhydrine ; seule l'isatine permet sa caractérisation aux doses où elle est présente dans nos jus. Après pulvérisation d'isatine, une autre tache bleue est apparue sur les chromatogrammes d'un jus (jus n°7) avec les R_f de l'hydroxyproline.

La recherche de la méthionine et du tryptophane est restée négative dans tous les échantillons.

Si nous exceptons les jus concentrés, la comparaison des échantillons entre eux, permet les remarques suivantes : les jus de raisin blancs se sont révélés plus riches en proline, les jus rouges plus riches en alanine, acide aspartique et glycocolle. Nous n'observons pas de différences caracteristiques pouvant être rapportées au mode de conservation quand il s'agit de la pasteurisation ou du mutage.

Les jus concentrés (n° 10 et 11) semblent proportionnellement plus riches que les autres puisque, même ramenés à la concentration qu'ils avaient avant l'évaporation du moût au cinquième,

Tableau VII

Evaluation approximative du taux des acides aminés et amides dans des jus de raisin

JUS n°	1 blanc	2 blanc	3 blanc	4 rouge	5 rouge	6 rouge	7 rouge	8 rouge	9 rouge	10 conc. blanc	11 conc rouge
∝alanine	++	++	++	++	+++	+++	++	++	+++	++++	++
acide γ aminobutyrique	++	+	+	++	+	++	t	+	+++	++	+
arginine +histidine	+	?	+	-	t	t	t	t	+	++	++
asparagine	?	-	-	-	-	?	+	-	-	-	-
acide aspartique	t	+	+	+	+	++	++	+	+	+	++
glutamine	-	++	-	-	-	?	+	++	-	-	-
acide glutamique	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	+
glycocolle	-	-	-	t	-	t	t	t	t	t	+
isoleucine-leucine	+	+	t	+	+	t	t	t	t	+	t
lysine	-	-	-	-	-	?	+	-	++	+	+
méthionine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
phénylalanine	+	t	-	t	t	-	+	t	-	t	+
oxyproline	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-
proline	++	+	++	t	+	+	+	+	+	+	+
sérine	+	++	+	+	+	++	+	+	t	++	+
thréonine	+	+	t	t	+	+	+	t	t	t	++
tryptophane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tyrosine	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-
valine	t	+	t	+	+	t	t	t	t	+	+

1) Pour les jus n° 9,10,11, les résultats du tableau sont ceux des jus dilués, passés sur colonne; pour les rapporter aux jus originels, il faut le multiplier respectivement par 2, par 5, et par 5.

2) L'évaluation quantitative des acides aminés a été figurée sur le tableau par les signes - à ++++, pour lesquels nous avons établi la correspondance suivante :

- : recherche négative
- t : traces < 10 mg d'acide aminé par litre
- \+ : 10 à 50 mg " " "
- ++ : 50 à 100 mg
- +++ : 100 à 150 mg
- ++++ : 150 à 200 mg

ils contiennent sensiblement plus de : alanine, arginine + histidine, lysine, valine, phénylalanine ; en revanche on ne retrouve pas d'amides même à l'état de traces.

Nous nous garderons d'en tirer des conclusions hâtives quant à l'influence de la concentration d'un moût sur le taux des acides aminés qu'il renferme, étant donné le nombre réduit d'échantillons étudiés. Peut-être faut-il attribuer ces teneurs plus ou moins élevées en acides aminés tout simplement au cépage. C'est ainsi que pour le jus n°9, nous ne trouvons pas d'autre explication ; ce jus se présente comme un jus ordinaire (jus rouge pasteurisé et non concentré) ; or son taux d'acides amines est nettement plus élevé, puisque pour le rendre comparable aux autres, il a fallu, avant la séparation des acides aminés, le diluer de moitié (quatre acides aminés atteignent ou dépassent 200 mg par l).

Cette influence évidente du cépage rend délicate la comparaison des résultats des différents auteurs qui se sont intéressés à la composition des jus et des moûts.

Les acides aminés identifiés par VALAIZE et DUPONT (26 et 85) dans les moûts de Muscat et de Clairette en 1953 ont tous été retrouvés dans nos jus ; il semble cependant que leurs échantillons contenaient quelques-uns d'entre eux à des taux plus élevés comme la tyrosine par exemple que nous ne caractérisons qu'une seule fois à l'état de traces ; mais nous avons identifié l'acide γ aminobutyrique, l'asparagine et la glutamine, dont les auteurs ne font pas mention. Si les acides aminés basiques sont présents dans nos échantillons ce n'est qu'à des taux généralement peu élevés. Pour CASTOR (19) histidine et arginine sont à côté de l'acide glutamique les acides aminés les plus abondants dans les moûts de Californie ; d'ailleurs les taux obtenus par cet auteur sont dans leur ensemble, nettement supérieurs aux nôtres ; en 1956, CASTOR et ARCHER (20) ont analysé un moût de Colombard qui contenait plus de 3 g de proline par litre. La proline n'est pas dans nos jus un acide aminé dominant ; peut-être pourrions-nous chercher à expliquer au moins

partiellement la différence des taux observes pour cet acide aminé, dans le fait que nos échantillons sont des jus de l'année, mais non des "moûts frais" ; or les auteurs ont signalé que dans le vin, la proline est l'acide aminé le plus rapidement sensible au vieillissement ; il est possible qu'il en soit de même dans les jus.

ASO et coll. (4) insistent sur la présence en quantité importante de glutamine, qu'on ne retrouve pas dans les jus étudiés par LUTHI et VETSCH (44).

Il nous faut encore mettre en parallèle, la composition en acides aminés de ces jus de raisin, et celle du vin dont l'étude a fait l'objet du premier chapitre.

Les jus que nous avons analysés sont, dans leur ensemble, nettement plus riches en acides amines que le vin ; en effet nous avons dû concentrer dix fois ce dernier et cinq fois seulement les jus avant de les soumettre à la chromatographie sur papier, pour évaluer les résultats en termes équivalents.

Exceptons cependant la cystine, identifiée dans le vin et que nous ne retrouvons dans aucun jus ; et surtout la proline dont le taux est environ cinq fois plus élevé dans le vin. L'explication que nous proposons plus haut, de la diminution de la proline lors du vieillissement du jus, est insuffisante ; si les échantillons examinés ne sont pas constitués par le moût frais du pressoir, ce sont cependant des jus très récemment préparés.

Les taux de : α alanine, acide aspartique, acide glutamique, font une chute importante des jus au vin ; la diminution, dans le cas de : glycocolle, sérine, valine, leucine, se fait dans le même sens mais plus discrètement.

L'acide γ aminobutyrique qui atteint jusqu'à 150 mg par litre dans les jus n'avait pas été caractérisé dans le vin ; nous ferons la même remarque pour les amides (irrégulièrement présents d'ailleurs dans les jus) et enfin pour les acides aminés basiques (dont le taux est surtout élevé dans les jus concentrés).

Nous pensons donc, avec CASTOR, que la participation des acides aminés du moût, aux processus de la fermentation, se solde d'une façon générale, par une diminution du taux de ces métabolites, plus ou moins importante selon les cas.

Ces conclusions n'ont pas toutefois un caractère définitif. Les remarques suivantes nous obligent à faire des réserves :

I°- La recherche des acides aminés dans le vin et les jus n'a pas été faite avec des moyens absolument identiques ; la technique unidimensionnelle utilisée au début de ce travail, nous a laissé des possibilités limitées dans certains cas d'identification.

2°- L'hétérogénéité des échantillons ne permet guère la généralisation des conclusions. Les jus examinés diffèrent sensiblement entre eux, diffèrent généralement plus encore de ceux étudiés par les autres auteurs ; on retrouve la même diversité dans les résultats concernant les vins, surtout au niveau des résultats quantitatifs.

L'étude comparative de la teneur en acides aminés des moûts et des vins ne peut fournir à notre avis de résultats démonstratifs que dans les conditions suivantes :

- disposer d'une méthode pouvant s'appliquer à tous les échantillons et susceptible de fournir des résultats quantitatifs.

- appliquer cette méthode à des vins et des moûts préparés à partir de la même variété de raisin.

C'est cette étude que nous nous proposons d'aborder dans la seconde partie de notre travail.

-:-

CHAPITRE III

-:-

DOSAGE DES ACIDES AMINES DANS LE MOUT DE RAISIN ET SES PRODUITS DE TRANSFORMATION

-:-

Dans cette seconde partie de notre travail, nous nous sommes proposé de refaire une étude plus rationnelle de l'azote aminé des moûts et des vins sous le rapport de ses variations au cours des processus de vinification. Le problème est complexe (et nous ne prétendons pas le résoudre) mais l'une au moins des variables qui entrent en jeu, celle de l'hétérogénéité de l'échantillonnage, peut être éliminée. Pour savoir ce que la fermentation alcoolique a modifié dans la composition azotée d'un vin, il faut que ce vin soit le produit de transformation d'un moût connu au départ. Il nous fallait donc des échantillons "comparables" c'est-à-dire dérivés du même moût. Nous ne pouvions y prétendre que si ceux-ci étaient préparés sur place. C'est à l'Institut Agronomique, au laboratoire des jus de fruits, qu'ont été effectuées les diverses opérations nécessaires à la préparation des lots d'échantillons(+). La suite des manipulations effectuees et la liste des échantillons obtenus ont été consignés dans le tableau VIII. Par ailleurs, il nous fallait mettre au point une technique chromatographique quantitative plus précise que le procédé estimatif décrit au chapitre précédent.

(+) Nous exprimons toute notre gratitude à Monsieur DUPAIGNE qui a bien voulu nous faire beneficier de toute sa compétence et de son expérience pour mener à bien cette partie de notre travail et nous remercions vivement ses collaborateurs pour l'aide précieuse qu'il nous ont apportée.

1) Préparation des échantillons

- Jus de pressoir ou moût : Le raison lavé et égoutté a été passé dans une presse à rouleaux afin de l'écraser grossièrement, puis dans le pressoir hydraulique (rendement : environ 10 kg de jus pour 15 kg de raisin).

- Jus de mixer : A l'aide d'un mixer, une petite partie de raisin égrappé a été transformée en une purée (contenant cependant encore quelques parcelles de peau et de pépins malgré un broyage prolongé). Le jus de mixer recueilli après décantation et filtration a été aussitôt soumis à l'analyse de même que le jus de pressoir.

- Jus stabilisés : A partir du jus de pressoir, ont été préparés:
  - du jus pasteurisé (à 75-80°)
  - du jus muté qui sera ensuite désulfité à température inférieure à 70° (La sulfitation a été faite à la dose de 1 g/ℓ. de SO_2 sous forme de bisulfite)
  - du jus concentré sous vide à température inférieure à 70°.

Vins

Le reste du moût a subi la fermentation alcoolique : égouttage et fermentation pour la vinification en blanc ; macération au contact des pulpes et fermentation alcoolique pour la préparation du vin rouge. L'ensemencement a été fait avec saccharomyces ellipsoïdus.

Des vins d'un autre type ont été préparés quelques mois après la période normale de vinification. Il s'agit de moûts stabilisés soit par mutage soit par concentration, que l'on a ultérieurement, ou désulfités, ou redilués, pour les rendre aptes à subir la fermentation alcoolique.

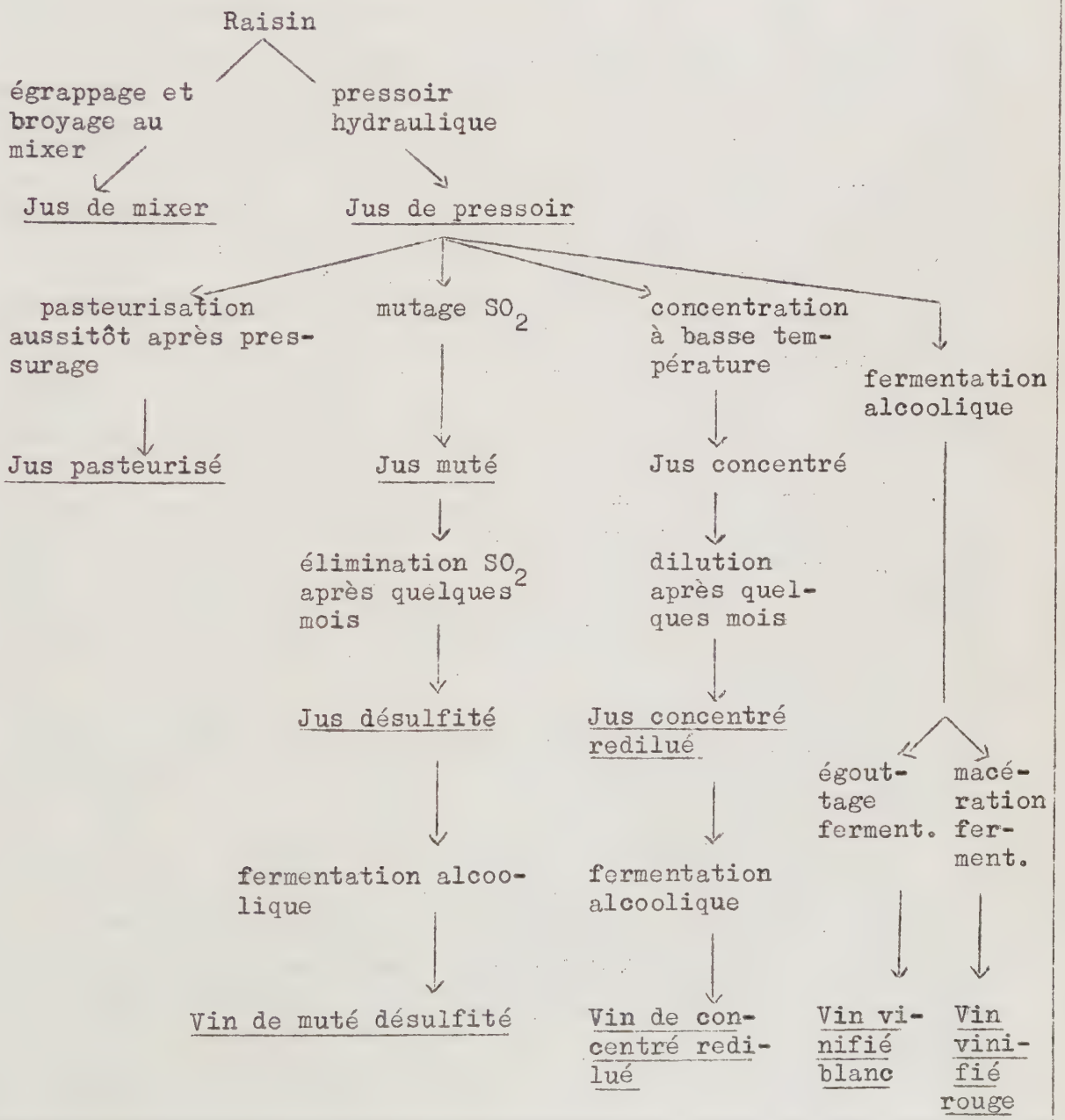
Tableau VIII

Echantillons préparés

Deux variétés de raisin :

- Gros-Vert du Mont-Ventoux
- Muscat noir

Pour chaque variété, on a préparé les échantillons suivants :



2) Etude des méthodes de dosage

Actuellement, et compte tenu des derniers progrès de la Technique, les possibilités de dosage individuel des acides aminés par chromatographie se rapportent à deux types de méthodes :

A) Chromatographie par échanges d'ions et élution

Cette méthode due à MOORE et STEIN a beaucoup évolué depuis sa mise au point en 1951 (53). Actuellement les auteurs fixent les acides aminés sur une colonne de polystyrène sulfoné et les éluent avec un tampon dont le pH et la force ionique varient régulièrement. L'effluent est recueilli par fractions de 0,5 ou 1 ml grâce à un collecteur automatique ; on trouve même dans le commerce un appareil réalisant de façon entièrement automatique, l'injection de ninhydrine dans les tubes contenant les acides aminés, la mesure de l'intensité de la coloration au moyen de photomètres et l'enregistrement de courbes dont les pics peuvent être intégrés avec une précision de 100 $\pm$ 3 % (50). La durée de l'analyse se trouve considérablement réduite (moins de 24 h), d'autant plus que la présence d'impuretés à doses "raisonnables" ne gène pas. Nous avons relevé dans la littérature quelques applications de séparations des acides aminés dans les aliments, effectuées par cette technique moderne (6 et 15) ; mais, à notre connaissance, aucun exemple de dosage des acides aminés du vin par ce procédé n'a encore été publié.

Dans un laboratoire qui ne possède pas le coûteux appareillage nécessaire, le dosage des acides aminés reste possible grâce à la chromatographie sur papier.

B) Chromatographie de partage sur papier

Les méthodes de dosage des acides aminés sur papier sont nombreuses ; des revues en ont été faites dans les principaux ouvrages traitant de cette méthode d'analyse : (BLOCK et coll. (9) LEDERER (42).

- Détermination directe : on peut avoir recours à la comparaison visuelle des taches (comme nous l'avons fait pour évaluer les acides aminés des jus de fruits), à la mesure de la surface des taches au planimètre, à la photométrie directe des chromatogrammes, ou encore au dosage de l'azote après découpage des rondelles de papier.

Ces techniques ne permettent qu'une approximation ; l'erreur admise est de ± 5 à 25 %.

- Dosage après extraction, qui permet une plus grande précision.

La révélation à la ninhydrine se fait généralement après le découpage ; aussi la localisation des taches pose-t-elle un problème difficile. Nous avons eu connaissance par les travaux de BOURDET et HERARD (13) d'une méthode de dosage des acides aminés que THOMSON, ZACHARIUS et STEWARD (83) ont utilisée à l'origine pour l'étude des composés azotés des plantes. Cette méthode offre le grand avantage de faire précéder l'extraction, de la révélation du chromatogramme par la ninhydrine. Mais pour que la réaction soit quantitative, elle doit se faire à 60° dans une enceinte saturée en éthanol et CO_2. Il faut donc prévoir une chambre de développement de la coloration, répondant aux conditions requises et apte à recevoir des chromatogrammes de grande taille.

Presque tous les auteurs localisent les taches sur le chromatogramme avant révélation soit en employant une solution diluée du réactif, soit en exposant le chromatogramme séché à la lumière U.V., soit enfin en le comparant à un chromatogramme témoin développé en même temps.

WOIWOD (88) révèle les taches découpées, à l'aide du réactif de POPE et STEVENS (70) au phosphate de cuivre ; plusieurs auteurs ont par la suite adapté cette technique avec plus ou moins de succès.

L'agent de révélation le plus couramment employé est la ninhydrine. Les "découpages" sont alors, en présence de ninhydrine, à la fois colorés et élués, selon des modes opératoires bien précis, et la coloration développée est mesurée au spectrophotomètre. Les méthodes proposées sont des adaptations de la technique de MOORE et STEIN (51) pour la coloration des solutions d'acides aminés élués. Elles diffèrent entre elles par la composition du réactif, la température, le pH et le temps de la réaction. Leur précision oscillerait autour de 5 %. Il semble cependant, étant donné la multiplicité des variantes proposées, entre 1950 et 1960, que la méthode n'ait pas donné pleine satisfaction aux auteurs qui l'ont utilisée.

3) Choix d'une technique opératoire

A) Méthodes essayées

Nous avons choisi un acide aminé test, l'α alanine en solution à 1 mg par ml ; des séries de taches de 10 à 40 μg d'alanine ont été faites sur papier Whatman n°1, découpées et révélées suivant les techniques ci-dessous :

I°- méthode de LANDUA et AWAPARA (41)

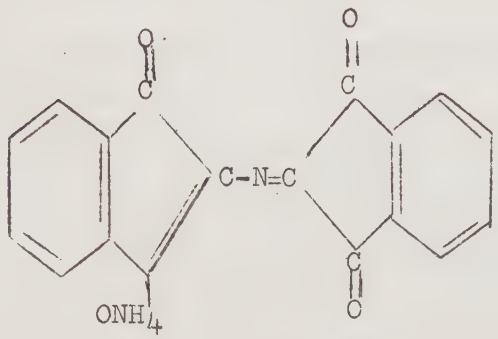
La réaction se fait à pH 5 en présence de pyridine et chlorure stanneux, au bain-marie bouillant.

2°- méthode de PEREIRA et SERRA (63)

Les auteurs estiment que la réaction est plus complète à pH 7 en milieu tamponné. Les colorations obtenues ont été ensuite mesurées au Spectrophotomètre. Dans les deux cas, les valeurs des densités optiques par rapport aux différentes concentrations ne nous ont pas permis de tracer des droites superposables d'une expérience à l'autre. Nous avons essayé de maîtriser successivement tous les paramètres de la réaction (réactif, temps de chauffage, agitation, refroidissement ...) sans obtenir de résultats fidèles. L'erreur principale provient, à notre avis, de la contamination

par l'ammoniac, du papier filtre ou des solutions.

On sait que la réaction de la ninhydrine avec le groupement NH_2 aboutit à la formation de la D.Y.D.A. (dicétohydrindylidène dicétohydrindamine) ; mais on en est réduit aux hypothèses quant au mécanisme de cette réaction (voir note à la fin du chapitre).



D.Y.D.A.

3°- MOORE et STEIN (51) ont observé que pour rendre la réaction pleinement reproductible, il fallait ajouter au réactif de l'hydrindantine (ninhydrine réduite) ou du chlorure stanneux, afin d'éliminer les réactions d'oxydation secondaires.

Lorsque l'hydrandantine existe préformée dans le milieu réactionnel, les conditions sont optimales pour les acides aminés, mais elles le sont aussi pour l'ammoniac présent, qui réagit presque quantitativement. Si l'on pouvait éliminer complètement l'oxygène du système, font remarquer les auteurs, on obtiendrait le maximum de coloration à partir des acides aminés, sans ajouter de ninhydrine réduite ; et la coloration due à l'ammoniac serait pratiquement nulle, puisque de lui-même, ce dernier est incapable de donner naissance à la ninhydrine réduite qui est nécessaire à la formation du complexe coloré.

4°- C'est pourquoi la méthode de SCHEWRDTFEGER (76) permettant de réaliser le dosage des acides aminés sur papier sans addi-

tion de réducteurs, par conséquent sans avoir à redouter les effets secondaires de l'ammoniac, nous avait donné quelque espoir. L'auteur, après avoir étudié les conditions expérimentales qui influencent le développement de la coloration (pH, pourcentage de ninhydrine, concentration en eau, température...) constate que ce qui est essentiel, c'est de réduire au maximum le temps de chauffage nécessaire pour porter à l'ébullition le réactif imprégnant le papier filtre. Le réactif proposé est une solution de ninhydrine dans le butanol aqueux à un pH voisin de 6. SCHWERDTFEGER recommande de plonger les tubes contenant réactif et papiers dans un bain de glycérine préalablement chauffé à 130° de façon à obtenir l'ébullition en une demi-minute. En opérant ainsi nous avons constaté que l'ébullition s'établissait en 1 à 2 minutes seulement, et les courbes obtenues n'étaient pas bonnes. Pour atteindre la température d'ébullition en une demi-minute nous avons dû chauffer le bain à 140-145° (alors que le butanol aqueux utilisé bout à 95° environ) ; dans ces conditions, il devenait impossible d'éviter les projections, même en utilisant des réfrigérants de 70 cm au-dessus des tubes à réaction. Sur une série d'essais, un tiers environ était perdu ; bien que les tubes restant nous aient permis de constater que la méthode pouvait donner de bons résultats, nous n'avons pas cru pouvoir la retenir.

5°- Enfin au cours de notre travail, nous avons eu l'occasion de comparer des résultats de dosages d'acides aminés dans quelques échantillons de vins par la méthode que nous décrivons ci-dessous, avec ceux obtenus, par ailleurs, par la voie microbiologique classique. Nous en reparlerons au chapitre V.

B - Technique adoptée

La technique que nous avons finalement adoptée, dérive d'un 6e procédé, celui de FOWDEN (28) ; cet auteur propose l'utilisation du réactif de MOORE et STEIN légèrement modifié, et prévoit un stade préalable d'élimination de l'ammoniac qui a pu se

fixer sur le papier. FOWDEN recommande lorsqu'il s'agit de matériel biologique de le soumettre au dessalage selon CONSDEN et coll. avant d'appliquer la chromatographie sur papier. Pour nos échantillons nous avons conservé la technique d'isolement des acides aminés sur Permutite, déjà employée pour la recherche des acides aminés dans les jus de fruits. Les deux premières phases du dosage sont les mêmes que celles développées au chapitre précédent.

I°- Séparation des acides aminés sur Permutite

L'élution à l'ammoniaque N a été complétée par le passage sur la colonne, d'ammoniaque 0,3N ce qui, selon MALANGEAU (47), libère la totalité des acides aminés et des peptides de faible poids moléculaire. Il est probable cependant que la récupération de l'arginine (qui est le plus basique) par l'ammoniaque n'est pas totale; BOULANGER et BISERTE ont fait des réserves sur ce point dès l'exposé de leur méthode (12).

2°- Chromatographie sur papier

Elle est bidimensionnelle et nous avons conservé le même couple de solvants : butanol/acide acétique/eau dans la première direction, phénol/eau dans la seconde. Comme nous l'avons signalé, ce système de solvants ne nous a pas permis d'obtenir une bonne séparation de l'histidine et de l'arginine et aussi en avions-nous essayé d'autres :

- méthanol/eau/pyridine 80:20:4 (73) en chromatographie ascendante pour la première direction, et phénol/eau 80:20 (27) en chromatographie descendante pour la seconde. Si les acides aminés basiques sont mieux isolés que dans le système précédent, leurs taches sont aussi étalées et d'autres acides aminés comme leucine et phénylanine sont difficilement séparables ; enfin la cystine nous a donné deux spots dans ces solvants.

- Le phénol tamponné à pH I selon SUBRAMANIAN et LAKSMINARAYAN (80) nous a permis d'obtenir des taches beaucoup plus rondes

dans le cas des acides aminés basiques mais si l'histidine se sépare bien de l'arginine, elle fait tache commune avec la lysine ; de plus acide aspartique et acide glutamique sont trop voisins de glycocolle et sérine ; enfin l'emploi de ce solvant très acide rend délicate la manipulation des chromatogrammes et exclut l'utilisation de matériel chromé dans les cuves.

C'est pourquoi nous avons décidé de conserver le couple de solvants choisis ; à notre avis c'est celui qui donne d'une façon générale les meilleures séparations, exception faite pour les acides aminés basiques, dont la bonne résolution est très délicate en chromatographie sur papier. Nous dosons ensemble histidine et arginine et nous les exprimons conventionnellement en arginine (+).

3°- Dosage proprement dit :

a) élimination des solvants : Les chromatogrammes après développement dans le butanol sont séchés dans un courant d'air 3 ou 4 heures, puis passés à l'étuve à 100° ; après développement dans le phénol ils sont à nouveau seches à l'air quelques heures, puis on les lave dans un bain d'éther redistillé. On termine par un passage de 10 à 15 minutes à l'étuve à 100°. Les travaux de FOWDEN ont montré que le chauffage du chromatogramme avant l'élimination de la plus grande partie du solvant entraîne des pertes d'acides aminés (28).

b) localisation des acides aminés sur le chromatogramme : On localise les acides aminés par leur fluorescence en lumière U.V. Mais cette localisation est difficile ; elle exige un minimum de 20 à 30 µg , selon les acides aminés et cette dose même n'est pas toujours suffisante pour repérer les taches. Nous avons eu régulièrement recours à la fois à la fluorescence en U.V. et aux

---

(+) BISERTE et coll.(8) ont proposé récemment une nouvelle méthode de séparation des acides aminés dans les milieux biologiques complexes, basée sur un couplage des méthodes chromatographiques et électrophorétiques.

chromatogrammes témoins développés en même temps et révélés à la ninhydrine. Les petites surfaces de papier où ont été localisés les acides aminés sont découpées et introduites dans des tubes de verre ; pour chaque tache on découpe dans une partie du chromatogramme aussi voisine que possible, un papier de même taille qui servira de "blanc".

c) élimination de l'ammoniac : Cette précaution s'est révélée indispensable, dans notre cas tout au moins, où la contamination du papier et des solutions était évidente et explique en grande partie l'échec de nos tentatives antérieures.

On introduit dans chaque tube 0,5 ml de NaOH 0,1 N ; on laisse une nuit sous vide en présence de H_2SO_4 ; on neutralise ensuite par q.s. d'acide citrique pour amener à pH 5 environ (il faut une quantité de l'ordre de 0,8 ml d'acide citrique 0,1 N).

d) développement et mesure de la coloration : Le réactif employé est obtenu par mélange des deux solutions suivantes :

(1)
ninhydrine	4 g
hydrindantine	0,080 g
méthylcellosolve	100 ml

(2)
$SnCl_2$ $2H_2O$	0,160 g
tampon citrate pH 5	100 ml

L'hydrindantine et le tampon ont été préparés selon les indications de MOORE et STEIN (51). FOWDEN recommande de conserver le réactif sous azote ; nous préférons le préparer extemporanément.

Tous les tubes (contenant les taches d'amino-acides ou les témoins) sont soumis aux traitements suivants :

- addition de 1,5 ml du réactif
- agitation mécanique des tubes 5 à 10 minutes
- chauffage au bain-marie bouillant 25 minutes
- refroidissement à l'air

- addition de 10 ml d'eau distillée
- agitation mécanique 3 minutes
- transvasement du contenu de chaque tube dans un flacon de 25 ml, élution et lavage du papier avec 10 ml d'acétone.
- addition d'eau jusqu'à 25 ml

L'auteur signale qu'il est possible, quand les quantités d'acides aminés à doser sont peu élevées, d'ajouter seulement 1 ml de réactif, quantité proportionnelle d'acétone et d'eau, et de compléter les tubes à 10 ml ; nous avons cependant constaté que dans ce cas la précision obtenue est sensiblement moins bonne.

La coloration violette développée dans chaque tube est mesurée au spectrophotomètre à 570 mμ par rapport au témoin. Pour chaque acide aminé on établit la courbe standard des densités optiques obtenues en fonction des quantités connues de l'acide aminé ; lors des dosages, les quantités inconnues seront déterminées en se référant à cette courbe standard (voir fig.5, la courbe standard de l'alanine). L'examen des courbes montre que les intensités de coloration obtenues à partir de quantités équimoléculaires des différents acides aminés, ne sont pas identiques mais seulement du même ordre (fig.6). Ces intensités de coloration rapportées à celle de l'alanine, prise comme unité, sont données dans le tableau IX.

Quant à la proline, son maximum d'absorption se situe à 440 mμ et même à cette longueur d'onde, la coloration relative obtenue avec la ninhydrine n'est que le tiers environ de celle de l'alanine prise comme référence. Nous avons conservé pour la proline, la méthode de dosage à l'isatine sur chromatogramme, en présence d'une gamme fine de proline témoin, décrite plus haut.

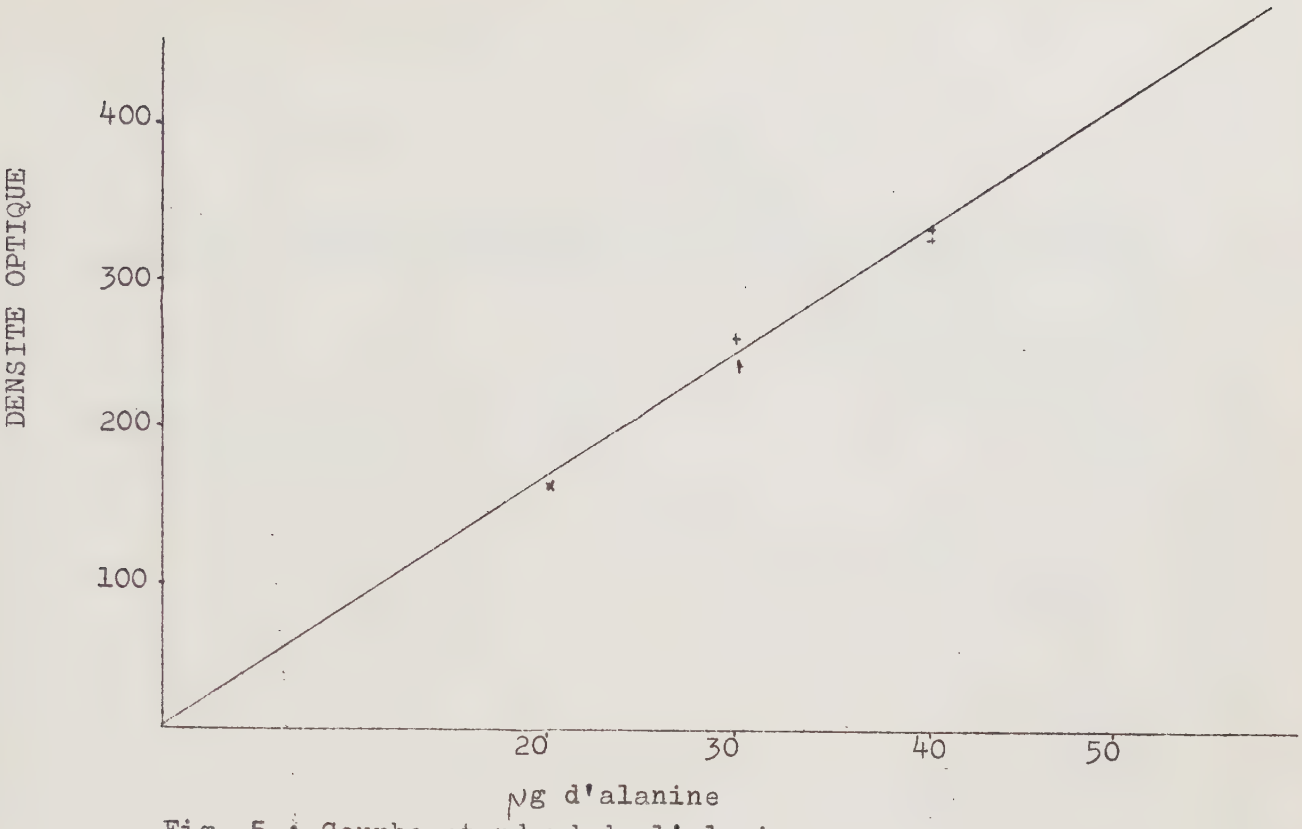


Fig. 5 : Courbe standard de l'alanine.

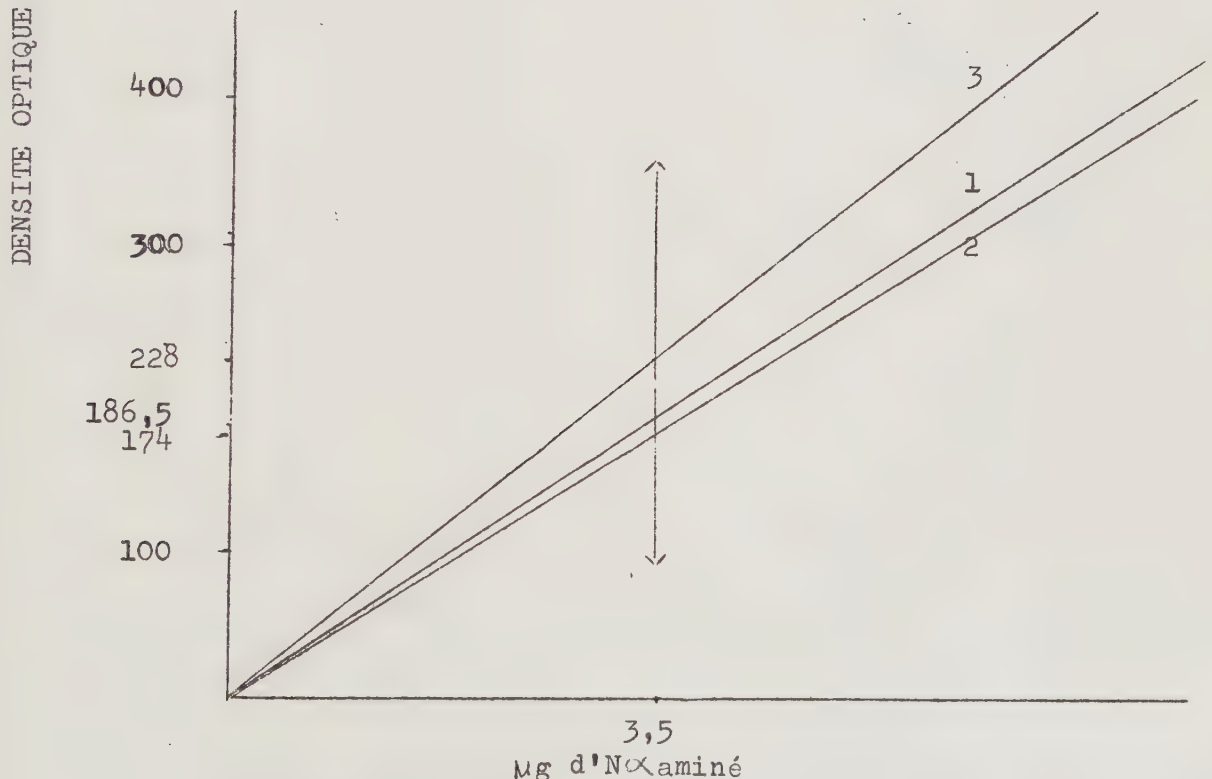


Fig.6 : Dispersion des courbes standard par rapport à celle de l'alanine (1)
Cas extrêmes : courbes de la phénylalanine (2) et de l'ornithine (3)

Tableau IX

Rendements en coloration à la ninhydrine, fournis par des quantités équimoléculaires des différents acides aminés.

Acides aminés	Rendements en coloration par rapport à la densité optique de l'alanine, prise égale à 1,00
Phénylalanine	0,93
Thréonine	0,94
Glycocolle	0,95
Sérine	0,96
Valine	0,97
Acide aspartique	0,97
Alanine	1,00
Leucine	1,03
Acide glutamique	1,03
Acide γ-aminobutyrique	1,05
Arginine	1,08
Lysine	1,12
Ornithine	1,22

e) Limites et précision de la méthode

Les limites d'emploi de la méthode nous sont fixées, et par la possibilité de localisation des taches, et par la possibilité de lecture au spectrophotomètre. FOWDEN estime que l'échelle d'utilisation est comprise entre 1 et 10 µg d'αNH_2-N pour un volume final de 25 ml et des cuves de 10 mm. A notre avis les deux conditions ci-dessus ne se trouvent réalisées que pour un minimum de 2 à 3 µg d'αNH_2-N. Par exemple 2,8 µg d'αNH_2-N correspondent à une tache de 18 µg d'alanine facilement repérable en lumière U.V et donnant après coloration à la ninhydrine, pour un volume final de 25 ml et des cuves de 10 mm, une densité optique de 0,150, ce qui est un minimum pour faire une lecture correcte au spectrophotomètre de Jobin et Yvon que nous utilisons. En complétant à un volume final de 10 ml il devient possible de doser des quantités de l'ordre de 1 µg d'αNH_2-N. Nous avons eu recours à cette solution pour les acides aminés présents à doses faibles sur les chromatogrammes lorsqu'il était impossible de concentrer davantage le mélange à analyser. Mais pour ces faibles quantités d'acides aminés la détection aux radiations U.V. est souvent déficiente ; il devient nécessaire de développer en même temps un témoin et de vérifier par pulvérisation à la ninhydrine du papier restant après découpage, que la localisation a été correcte.

La précision de la méthode apparaît satisfaisante ; grâce au traitement préalable d'élimination de l'ammoniac, l'erreur introduite par les valeurs irrégulières et souvent élevées des "blancs" de papier, se trouve considérablement réduite. Nous avons estimé que dans le dosage de 20 à 50 µg d'alanine par exemple, cette erreur ne dépasse pas 4 % (les témoins donnant par rapport à l'eau une densité optique $>$ 0,210 sont rejetés). Les courbes standard sont reproductibles avec une erreur maximale de $\pm$ 5 %.

Les essais de la méthode ont été faits par comparaison des densités optiques données par les acides aminés dosés, et celles correspondant aux quantités connues de la courbe standard du même

acide aminé.

Des mélanges d'acides aminés en quantités connues ont été soumis aux mêmes opérations que celles effectuées lors du dosage des melanges inconnus ; passage sur Permutite, élution, concentration, chromatographie bidimensionnelle, localisation et réaction colorée à la ninhydrine. Le pourcentage final de récupération d'un acide aminé du mélange est reporté dans le tableau ci-dessous : (tableau X).

Tableau X

	Pourcentage final de récupération après passage sur résine et chromatographie bidimensionnelle du mélange (4 résultats)
Acide aminé :	
α alanine	84 - 97,5
sérine	83 - 93,5
valine	89 - 96,5
thréonine	88,5 - 98
glycocolle	82,5 - 95
acide γ aminobutyrique	89 - 94,5
acide aspartique	85 - 94,5
acide glutamique	82 - 91
leucine	78 - 91
phénylalanine	78 - 89,5
ornithine	72 - 83
arginine	74 - 86
lysine	75 - 84,5

La méthode permet donc de retrouver de 85 à 95 % de l'acide aminé dans la plupart des cas ; pour la leucine et la phénylalnine la récupération est un peu inférieure, peut-être à cause de

la position de leurs spots très près du front du phénol.

Dans le cas des acides aminés basiques la précision que l'on peut attendre du dosage est beaucoup plus variable ; cela tient surtout à la forme des taches en "queue" que ces acides aminés donnent dans le phénol ; de plus nous avons constaté expérimentalement dans le cas de l'arginine, que l'élution de cet acide aminé par l'ammoniaque, après fixation sur Permutite n'était pas totale.

Cette méthode que nous avons appliquée au dosage des acides aminés dans nos échantillons ne nous a pas donné entière satisfaction sur tous les points :

- Les opérations nécessaires au dosage sont nombreuses et assez longues.
- Pour un acide aminé dans un mélange le pourcentage de récupération auquel on peut s'attendre n'est que de 85 à 95 %, quelquefois moins.
- La technique de coloration n'est pas applicable à la proline
- Pour les acides aminés dosables elle exige des doses minimales relativement élevées (2,5 μg d'α NH_2-N pour un volume final de 25 ml et 1 μg d'α NH_2-N pour un volume final réduit à 10 ml).

Nous pensons que si la chromatographie sur papier des acides aminés est une excellente technique de recherche qualitative, elle ne peut prétendre être à l'heure actuelle qu'une assez bonne méthode de dosage.(+)

(+) Etant donné l'intérêt que présente le dosage de faibles quantités d'acides aminés, les recherches se poursuivent actuellement dans plusieurs directions.
BISERTE et coll.(7) ont proposé récemment une évaluation quantitative des dinitrophényl amino-acides par chromatographie sur papier, avec, semble-t-il, une très bonne précision.
D'autres auteurs se sont attachés ces dernières années, à éclairer le mécanisme de la réaction ninhydrine-groupement

Nous avons cependant conservé cette méthode parce qu'elle ne demande qu'un appareillage très modeste que l'on peut trouver dans n'importe quel laboratoire ; appliquée dans des conditions strictement parallèles à tous les échantillons que l'on veut comparer elle nous fournit des résultats beaucoup plus exploitables que la simple estimation visuelle des taches.

---------- -:-

... aminé, qui est en fait, très mal connu.

NEUZIL et BRETON (55) ont exposé les séquences réactionnelles proposées par les différents auteurs. Presque tous s'accordent à reconnaître que le produit final de la réaction est le pigment bleu de Ruhemann (D.Y.D.A NH_4), mais certains font de l'hydrindantine un précurseur de ce pigment, les autres non; une hypothèse séduisante est celle proposée par SCHONBERG de la formation intermédiaire d'une base de Schiff. Il semble que, selon les conditions opératoires, l'une des réactions possibles devienne dominante, mais il est probable que plusieurs se développent simultanément.

MEYER (49) a montré qu'il doit exister une"ninhydrine active" qui conditionne la sensibilité de la réaction et dont la formation est favorisée par la presence de solvants organiques. NEUZIL et BRETON (56 et 57) insistent également sur l'action favorisante des solvants organiques et particulièrement de l'alcool butylique tertiaire ; cette influence peut être attribuée non seulement à l'activation de la ninhydrine, mais encore à l'activation de l'acide aminé, dont la forme électriquement neutre dans les solvants organiques, ne gêne pas l'approche des molécules de ninhydrine.

Dans leurs dernières publications NEUZIL et coll. (57) proposent de nouvelles hypothèses fondées sur l'étude quantitative de la réaction d'un grand nombre de composés aminés avec la ninhydrine. La "forme active" de cette dernière correspondrait à une structure d'hémicétal de la ninhydrine en milieu alcoolique. Il semble bien, d'autre part, que les deux premiers temps de cette réaction complexe ninhydrine-composés aminés, soient :

1°- La formation d'une cétimine

2°- la transformation de cette cétimine en aldimine. Cette tautomérisation met en oeuvre un processus de "prototropie", explicable selon la structure des composés aminés par l'hyperconjugaison ou par un transfert électronique circulaire. Les auteurs précisent d'ailleurs que ces hypothèses de travail ne sont probablement valables que dans la limite des conditions opératoires qu'ils se sont imposées.

De nouveaux travaux sont en cours et on peut espérer, quand on connaîtra mieux le mécanisme de la réaction, améliorer le processus de son application aux dosages colorimétriques du groupement aminé, dans le sens d'une sensibilité et d'une reproductibilité pleinement satisfaisantes.

CHAPITRE IV

-:-

APERCU SUR L'EVOLUTION DU TAUX DES ACIDES AMINES AU COURS DE DIVERSES TRANSFORMATIONS DU MOUT : MOUTS FRAIS ET JUS CONSERVES

-:-

A partir des deux variétés de raisin (Gros vert et Muscat) nous avons donc obtenu, comme nous l'avons exposé au Chapitre III, du moût frais de pressoir, du moût préparé au mixer (qui permet l'écrasement des pépins et des peaux, et leur épuisement au moins partiel par le jus), et des jus conserves par les différentes techniques utilisées dans l'industrie des jus de fruits. Nous avons effectué sur ces échantillons des dosages chimiques et des analyses chromatographiques.

1) Dosages chimiques :

L'azote total a été dosé dans l'appareil à micro-Kjeldhal de F. MARTIN en employant pour la minéralisation un mélange de : SO_4K_2, SO_4Cu, Se, et l'azote ammoniacal par la méthode de Boussingault. Enfin l'azote aminé a été évalué par la méthode de Sörensen en se plaçant dans les conditions de dosage recommandées par RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (74) (Tableau XI).

Tableau XI

en mg/litre	Gros Vert		Muscat	
	Jus de pressoir	Jus de mixer	Jus de pressoir	Jus de mixer
N. total	275	343	201	245
N. ammoniacal	57,4	52	8,7	18,8
N. aminé (Sörensen)	52,2	104,4	46,5	64,6

2) Analyses chromatographiques :

Pour tous les échantillons à étudier, nous avons développé des chromatogrammes uni- et bidimensionnels que nous avons révélés à la ninhydrine pour la caractérisation des différents acides aminés (R_f , coloration immédiate, coloration après quelques jours) et d'autres chromatogrammes à deux dimensions et à différentes concentrations pour les dosages (10 à 80 µl de liquide concentré 10 à 25 fois par rapport à l'échantillon initial).

Les résultats du dosage des acides aminés dans les jus sont résumés dans les tableaux XII et XIII. Les dosages ont été faits selon la technique exposée au chapitre précédent. Les taux, en mg par litre, sont la moyenne de deux déterminations faites à des concentrations différentes. La méthode étant peu appropriée au dosage des très faibles quantités d'acides aminés, nous avons seulement signalé la présence de ces derniers à l'état de traces (t.) ou en quantité sensible (+). La sensibilité maximale de la méthode est, nous l'avons dit, de l'ordre de 1 µg d'α NH_2-N par tache quand le volume final de la réaction est complété à 10 ml soit 5 à 13 µg d'acide aminé par tache selon le poids moléculaire de l'acide aminé considéré. Or nous avons constaté, au cours du développement de nos analyses, que nos échantillons étaient relativement pauvres en acides amines particulièrement

dans le cas des vins.

Il aurait été souhaitable d'augmenter la sensibilité de la méthode ; c'est sous cette optique que nous avons essayé par exemple de faire les lectures au spectrophotomètre en cuves de 40 mm au lieu de 10. Nous n'avons finalement pas tenu compte des chiffres obtenus en reculant au maximum les limites d'application de la méthode, car en agissant ainsi, nous nous plaçons dans les conditions de précision les plus mauvaises : forte concentration du liquide à analyser, augmentation de l'erreur absolue due au nombre accru des mesures à la pipette, élution des taches sur papier par un volume réduit d'eau et d'acétone, et surtout localisation des acides aminés sujette à erreur puisqu'on est privé du secours des radiations U.V. et qu'on doit obligatoirement recourir au développement du chromatogramme témoin.

Nous avons donc choisi de ne pas retenir de chiffres inférieurs à une certaine limite qui, compte tenu d'une concentration maximale acceptable du liquide à analyser et du poids moléculaire de l'acide aminé à doser, correspond à une teneur finale en mg par litre, qui s'étage de 3 (glycocolle) à 7 (arginine).

Nous rappelons que la proline n'a pu être dosée par la même méthode ; que la leucine et l'isoleucine ont été évaluées ensemble et exprimées en leucine ; il en est de même pour l'histidine et l'arginine exprimées en arginine.

Tableau XII

Taux des acides aminés dans les moûts et les divers jus de raisin, variété Gros Vert (en mg par litre)

Acide Aminé	Méthode d'évaluation	Jus de pressoir	Jus de mixer	Jus pasteurisé	Jus muté	Jus désulfité	Jus concentré et redilué
proline	Gammes témoins sur papier (ACHER)	350	450	340	235	190	230
arginine + hist.	dosage selon FOWDEN	83	162	80	92	103	59
acide γ aminobutyrique	"	57	50	42	44	33	39
acide glutamique	"	36	64	45	40	36	21
α alanine	"	35	42	37	37	35	32
valine	"	12	15	10	10	9	10
leucine+isol.	"	10	13	9	12	11	11
phénylalanine	"	10	13	9	10	11	8
sérine	"	6	14	8	10	8	6
thréonine	"	6	13	8	10	10	5
ac.aspart.	"	11	26	11	12	13	8
lysine	"	7	6	8	8	8	12
ornithine	"	6	13	8	9	8	7
glycocolle	"	3	<3	<3	3	<3	3
glutamine	évaluation approchée sur ch	+	++	+	+	+	-
asparagine	"	+++	+	t	t	t	t
cystine	"	-	-	-	-	-	-
tryptophane	"	t	-	-	-	-	-
tyrosine	"	t	+	t	t	t	-
tache X	"	t	t	t	t	t	t
β alanine	"	-	-	t	-	-	-
ac.pipécolique	"	t	-	-	-	-	-

Tableau XIII

Taux des acides aminés dans les moûts et les divers jus de raisin, variété Muscat. (en mg par litre)

Acide Aminé	Méthode d'évaluation	Jus de pressoir		Jus de mixer		Jus pasteurisé	Jus muté	Jus désulfité	Jus conc. et redilué
		avt. hyd.	après hyd.	avt. hyd.	après hyd.				
proline	Gammes témoins sur papier (ACHER)	25	48		50	40	26	25	23
arginine +histid.	Dosage selon FOWDEN		51		79	60	50	59	38
acide γ aminobutyr.	"	24	42		33	40	34	18	23
acide glutamique	"	<5	20		32	25	18	22	15
α alanine	"	<5	23	<5	49	21	18	18	12
valine	"		9	6	13	8	8	7	<6
leucine-isoleu.	"		20	10	21	19	20	21	13
phénylalanine	"		12	10	20	15	18	15	10
sérine	"		15		28	12	14	15	10
thréonine	"		14	<7	30	15	13	11	8
ac.aspart.	"		11		24	12	15	15	11
lysine	"		19		23	20	15	19	15
ornithine	"		16		21	17	15	13	10
glycocolle	"		7		11	<5	<5	7	<5
glutamine	Evaluation approchée sur chromato.		-		-	-	-	-	-
asparagine	"		-		-	-	-	-	-
cystine	"		t		t	-	t	t	t
tryptophane	"		-		-	-	-	-	-
tyrosine	"		-	+	-	+	+	+	-
tache X	"		t	t	t	+	t	t	t
β alanine	"		-		-	-	-	-	-
ac.pipéc.	"		-		-	-	-	-	-
peptides		++++		++++					

3) Examen des résultats et comparaison avec les données bibliographiques :

A) Les moûts (ou jus de pressoir)

Nous devons d'abord signaler le comportement particulier du Muscat. Le jus à la sortie du pressoir (le jus de mixer également) nous a donné par chromatographie bidimensionnelle après traitements habituels, à côté de spots d'acides aminés peu nombreux et peu importants, de longues traînées à bas R_f en butanol, et colorées par la ninhydrine ; nous avons pensé qu'il s'agissait de peptides de faible poids moléculaire ; ces derniers donnent en effet une réaction positive avec la ninhydrine et sont susceptibles d'être adsorbés en même temps que les acides aminés sur la Permutite Un nouvel éluat a été soumis à une hydrolyse ménagée qui a libéré les acides aminés usuels, ainsi que le montre le tableau XIII.

Nous avons opéré de la façon suivante : 1 ml d'éluat concentré a été amené à sec puis on a ajouté 1 ml de HCl 2N ; le tube a été porté à l'étuve à 80° pendant quelques heures, ce qui a été suffisant pour réaliser l'hydrolyse.

Dans le cas du Muscat, les taux d'acides aminés du moût, auxquels nous nous référerons sont donc ceux obtenus après hydrolyse ; mais nous insistons sur le fait qu'il s'agit d'une hydrolyse faite à une température inférieure à 100°, en présence d'un acide relativement peu concentré, et sur l'éluat de la résine c'est-à-dire sur le jus déjà débarrassé des autres matières organiques responsables en grande partie, on le sait, des pertes en acides aminés observées au cours de l'hydrolyse. Nous avons d'ailleurs constaté par la suite que la seule pasteurisation du jus à 80° avait abouti également à l'hydrolyse de ces peptides.

Dans l'ensemble, le taux des acides aminés est peu élevé dans les moûts examinés. Seule la proline atteint 350 mg dans le Gros Vert ; dans le Muscat elle occupe la seconde place avec 48 mg. La proline mise à part, les acides aminés les plus abondants dans les deux variétés sont l'arginine + histidine, l'aci-

de γ aminobutyrique, l'acide glutamique et l'alanine, qui atteignent de 20 à 83 mg par litre. Les autres acides aminés usuels sont tous représentés mais à doses faibles ou même à l'état de traces. Le tryptophane a été caractérisé dans le moût blanc et seulement sur les chromatogrammes unidimensionnels en butanol ; il n'apparaît pas dans le Muscat mais c'est un acide aminé qui résiste mal à l'hydrolyse.

Nous avons trouvé dans les deux échantillons des traces que nous n'avons pas identifiées (tache X située entre proline alanine et arginine : R_f 0,25 en butanol et 0,82 en phénol ; tache 13 sur le chromatogramme p.33). Enfin sur les chromatogrammes du moût de Gros Vert, nous avons repéré un spot dont les R_f sont identiques à ceux de l'acide pipécolique ou acide pipéridine 2 carboxylique.

Différents auteurs ont caractérisé, grâce à la chromatographie sur papier, les acides aminés des moûts ; certains travaux ont déjà été cités dans les revues bibliographiques antérieures (DUPONT, ASO) ; d'autres noms nous sont familiers pour des recherches parallèles effectuées dans les vins (LUTHI et VETSCH, COLAGRANDE). Nous avons cru utile pour une étude comparative de rénir les résultats se rapportant aux moûts dans le tableau XIV, avec les estimations approchées données par leurs auteurs.

Les seuls documents quantitatifs que nous ayons trouvés dans la littérature sont dus à la méthode microbiologique ; ceux de CASTOR 1953 (19) et un important travail plus récent dû à LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (40) (voir tableau XV).

Les taux obtenus par ces auteurs sont généralement plus élevés que les nôtres, surtout ceux de CASTOR. Tous les auteurs s'accordent à reconnaître l'abondance de la proline et de l'acide glutamique dans les moûts ; les teneurs en arginine, sérine, thréonine, sont également élevées chez CASTOR et LAFON ; elles le sont relativement moins que proline et acide glutamique, chez les au-

teurs ayant travaillé par chromatographie.

L'alanine que CASTOR et LAFON ne mentionnent pas est un acide aminé important chez tous les autres auteurs. Sa haute sensibilité à la ninhydrine le "favorise" sans doute dans les estimations approchées ainsi que l'ont fait remarquer BIDAN et ANDRE (5) ; nous l'avons nous-même constate en passant de l'estimation approximative au dosage ; cependant elle occupe encore le quatrième rang dans nos moûts.

Les teneurs en leucine-isoleucine, valine, sont peu élevées excepté pour CASTOR ; leur présence à l'état de traces dans le moût a permis à divers auteurs de montrer l'insuffisance de la réaction d'Ehrlich pour expliquer la formation, à partir de ces acides aminés, des alcools supérieurs de la fermentation (alcools amyliques, isobutanol) (+).

Dans nos échantillons de moûts, nous avons pu doser l'acide γ aminobutyrique déjà signalé dans tous nos jus de raisin et qu'ont révélé également, sur leurs chromatogrammes de moûts, LUTHI et ASO.

Asparagine et glutamine sont présents irrégulièrement dans les moûts ; nous pouvons faire la même remarque à propos de nos jus de raisin et à propos des jus frais d'ASO.

Les acides aminés suivants : β alanine, acide α aminobutyrique, méthionine, méthionine-sulfone, méthionine-sulfoxyde, signalés quelquefois dans les moûts n'ont pu être mis en évidence dans nos échantillons.

(+) PEYNAUD et GUIMBERTEAU (68) ont établi récemment que les leucines et la valine du moût donnent bien naissance aux alcools supérieurs de la fermentation, mais le mécanisme d'Ehrlich n'est pas le seul processus intervenant dans l'assimilation de ces acides aminés. De plus, les alcools supérieurs peuvent aussi se former à partir des autres acides aminés, et enfin une partie provient directement des sucres (31).

Tableau XIV

Caractérisation des acides aminés par chromatographie dans les moûts. (d'après la bibliographie)

	Dupont 1953 6 moûts	Luthi et Vetsch 1953 2 moûts	Aso 1954 4 jus frais	Colagrande 1957 moût rouge	Colagrande 1957 moût blanc
α alanine	+ à +++	+++ et +++	++	+++	++
β alanine			- à +	++	-
acide α aminobutyrique			- à ++		
acide γ aminobutyrique		++ ++	+ à ++		
arginine		+	++	++	+
histidine			±	+	-
asparagine			- à +		
acide aspartique	+ à ++	++ ++	+ à ++	++	++
cystine				+	-
glutamine			+ à ++		
acide glutamique	+ à +++	+++ +++	+ à ++	+++	++
glycocolle	- à +	+ +	- à ++	+	++
isoleucine) leucine (	++		- à +	++	++
lysine			- à +	+	+
méthionine				+++	++
méthionine sulfoxyde				+	-
méthionine sulfone				+	-
ornithine				+	+
phénylalanine	+ à ++		- à +	+	+
proline	++	+ ++	- à ++	+++	+++
sérine	+ à ++	++ ++	+ à ++	++	+
thréonine	- à +	++ +	+ à ++	+	+
tryptophane			± à +		
tyrosine	++			+	+
valine	++	+ +	- à +	++	++

Tableau XV

Dosage des acides aminés dans les moûts ; résultats comparés (mg par litre)

	Castor 1953 microbiologie 7 moûts teneurs extrêmes	Lafon et Peynaud 1959 microbiologie 8 moûts teneurs moyennes	J. Blanc chromatographie	
			moût de Gros Vert	moût de Muscat
∝ alanine			35	23
acide γ amino-butyrique			57	42
arginine	70 à 1030	327	)	)
histidine	57 à 148	11	(83	(51
			)	)
asparagine			+++	+
acide aspartique	22 à 99	2	11	11
cystine	2 à 5	0	-	t
glutamine			+	-
acide glutamique	335 à 1067	173	36	20
glycocolle	3 à 14	22	3	7
isoleucine	31 à 100	7	)	)
leucine	42 à 77	20	(10	(20
lysine	11 à 20	16	6	19
méthionine	11 à 28	1		
ornithine			6	16
phénylalanine	29 à 78	5	10	12
acide pipécolique			t	-
proline		266	350	48
sérine		69	6	13
thréonine		258	5	14
tryptophane	22 à 65	0,6	t	-
tyrosine	7 à 46	0	t	-
valine	41 à 94	6	12	9

Castor 1956
microbio.+chromato.
A.A.les + abondants
dans le moût :
proline-arginine
sérine-acide glutamique-thréonine

B) Les jus de mixer

Dans le jus préparé par écrasement des grains de raisin au mixer et filtré, on retrouve les mêmes acides aminés que dans le moût normal, mais en quantité nettement supérieure (+). L'augmentation est particulièrement sensible pour l'arginine-histidine, l'acide glutamique,la sérine, la thréonine, l'acide aspartique, l'alanine. On constate cependant dans le moût blanc une diminution d'asparagine et on ne retrouve plus les traces de tryptophane et d'acide pipécolique apparues sur les chromatogrammes du moût de pressoir. CARBALLO (16) en préparant des jus de Muscat, a chromatographié les acides aminés des peaux de raisin et retrouvé des quantités considérables de : glycocolle, acide aspartique, sérine, thréonine, et surtout alanine et des quantités plus faibles des autres acides aminés.

Cette augmentation de l'azote aminé va de pair avec l'augmentation de l'azote total (v.Tableau XI). En 1953 PEYNAUD et MAURIE (69) avaient constaté que si la pellicule et le pépin représentent moins du quart du poids total du grain, ils renferment les trois-quarts de l'azote total contenu dans le grain de raisin arrivé à maturité.

Le jus de raisin tel qu'on le prépare actuellement, est donc privé de la majeure partie de la réserve azotée du grain. L'homogénéisation de ce dernier, permettant l'utilisation des substances azotées des pellicules et des pépins, devrait accroître les propriétés nutritionnelles du jus de raisin.

L'apport en tanins s'en trouverait sans doute accru et le jus de raisin ainsi préparé serait peut-être de conservation plus difficile et d'apparence moins séduisante. Il nous semble cependant que le problème pourrait être posé. Des essais ont été faits

---

(+) Ce jus que nous appelons jus de mixer ne correspond qu'à un épuisement partiel des substances des pépins, car nous n'avons pu parvenir qu'à un écrasement imparfait de ceux-ci.

en ce sens à l'étranger pour le jus d'orange notamment, préparé par broyage du fruit complet.

C) Les jus conservés

Parmi les jus conservés que nous avons soumis à la chromatographie, dans le but d'une comparaison avec les jus frais, l'un, le muté, a été seulement additionné de bisulfite ; les trois autres ont subi un chauffage à une température inférieure à 80° : jus pasteurisé, désulfité, concentre.

Les solutions d'acides aminés sont théoriquement peu sensibles à un chauffage modéré. Cependant MAILLARD (46) a signalé dès 1912 la possibilité de pertes en acides aminés quand on les chauffe en présence de sucres ; or, dans le moût les sucres (glucose et lévulose) atteignent 150 à 200 grammes par litre.

Par ailleurs, KOCH et SCHWAHN (38) ont étudié le comportement, non pas des acides aminés libres mais des protéines, lors du mutage et de la désulfitation des moûts ; de leurs travaux il ressort que les protéines solubles, qui ne sont pas transformées pendant le mutage, sont complètement dénaturées après la désulfitation, effectuée par chauffage à 60-65° et à un pH de 3 à 4 qui est le pH des moûts. On pouvait donc se demander si cette attaque des molécules protéiques pendant le chauffage du jus de raisin ne pourrait se traduire par une libération d'acides aminés.

L'examen des résultats (tableaux XII et XIII) permet de souligner les points suivants :

a) jus pasteurisés

Si on compare les jus pasteurisés aux jus frais, on ne remarque pas de modifications essentielles. Le taux de la plupart des acides aminés doit être considéré comme stationnaire dans les limites de précision du dosage. On note cependant dans le jus pasteurisé de Gros Vert, la disparition du tryptophane et de l'acide pipécolique, que nous avions trouvés à l'état de traces d'ailleurs, dans le moût frais, et la diminution des teneurs en asparagine et

acide γ aminobutyrique ; le taux de quelques autres acides aminés (acide glutamique, thréonine, sérine, ornithine) est en légère hausse. Les écarts, qu'ils se traduisent par des pertes ou des gains, ne dépassent pas 30 % par rapport aux moûts frais. Dans le jus de Muscat pasteurisé les modifications sont du même ordre, qu'elles concernent les augmentations des taux de phénylalanine et acide glutamique, ou la diminution de ceux de sérine et glycocolle ; dans ce jus pasteurisé de raisin rouge on peut remarquer encore la disparition des traces de cystine révélées dans le jus frais ; par contre on retrouve la tyrosine présente dans le jus de mixer mais qui avait dû disparaître à l'hydrolyse du jus de pressoir.

b) jus mutés et désulfités

Dans les jus désulfités deux modifications plus importantes sont à signaler, et aussi bien dans la variété blanche que dans la rouge : la chute des taux de proline et d'acide γ aminobutyrique, qui ne sont plus que la moitié à peine de ce qu'ils étaient dans le moût frais. Cette diminution se manifeste plus nettement quand on passe du jus frais au jus muté pour la proline et surtout après le désulfitage dans le cas de l'acide γ aminobutyrique. Le taux de thréonine se trouve nettement augmenté mais dans le cas du moût blanc seulement.

Les autres variations concernant les taux d'acides aminés dans les jus désulfités sont des variations mineures ; nous avons noté qu'elles traduisent parfois une exagération des tendances qui s'étaient manifestées dans le jus pasteurisé : ainsi dans le jus pasteurisé de Gros Vert on avait remarqué une augmentation de sérine, thréonine, ornithine, par rapport au moût frais ; dans le jus désulfité, le taux de ces acides aminés est encore plus augmenté. Dans le cas du Muscat également l'augmentation du taux d'alanine, la diminution des taux de phénylalanine et acide aspartique constatées dans le jus pasteurisé par rapport au moût frais, se sont encore accentuées dans le jus désulfité.

c) jus concentrés et redilués

C'est dans le jus, concentré à la sortie du pressoir, et redilué au moment de l'analyse, que les transformations sont les plus importantes. Dans le cas du Gros Vert on note la disparition de la glutamine et de la tyrosine que l'on trouvait en petite quantité sur tous les chromatogrammes des autres jus de même variété, et l'abaissement sensible (20 à 40 %) de : proline, arginine, histidine, acide γ aminobutyrique, acide glutamique, acide aspartique par rapport au jus frais. Seule la lysine est en augmentation.

Dans le jus de Muscat concentré et redilué, l'appauvrissement en acides aminés est plus général ; il est de 20 à 60 % selon les cas et intéresse pratiquement tous les acides aminés (+).

En conclusion, la composition en acides aminés du jus pasteurisé reproduit assez fidèlement celle du moût frais ; la plupart des acides aminés sont retrouvés pratiquement aux mêmes taux. Si quelques teneurs ont varié, ces teneurs restent comprises entre 70 et 130 % de ce qu'elles étaient dans le moût frais. Il semble que c'est à ce mode de conservation des jus qu'on doive donner la préférence quand le choix est possible. Dans les jus désulfités en effet, les modifications ne sont encore, d'une façon générale, que de l'ordre de 20 à 40 %, mais deux acides aminés sont plus particulièrement touchés : proline et acide γ aminobutyrique, dont les taux sont réduits de moitié. Ces perturbations, au niveau des acides aminés, en admettant qu'elles soient dues au désulfitage, ne sont cependant en rien comparables à celles retrouvées par KOCH au niveau des protéines.

(+) Les résultats énoncés plus haut (Ch.II), après comparaison de deux jus concentrés, aux mutés et pasteurisés d'une série de jus de raisin commerciaux, se trouvent partiellement infirmés par les présentes conclusions ; les jus concentrés s'étaient en effet révélés plus riches que les autres sauf au point de vue de leur teneur en amides. Nous pensons que nos derniers résultats sont certainement plus valables qui s'appuient sur la comparaison des jus stabilisés ayant pour origine le même moût déjà connu.

Les jus concentres, eux, sont incontestablement appauvris; un seul acine aminé dans le jus rouge et deux dans le jus blanc, sont restés au même taux que dans le moût ; la lysine dans le Gros Vert est augmentée ; pour tous les autres acides aminés, la comparaison entre les jus frais et les jus concentrés se solde, au détriment de ces derniers, par des pertes qui vont de 20 à 60 %.

Le chauffage des jus est-il responsable des modifications constatées ? Si l'on met en parallèle les résultats dans les différents jus stabilisés et les procédés de stabilisation, on est tenté d'établir une relation entre les modifications constatées et la durée, plutôt que la température de chauffage. En effet la pasteurisation se fait à 75-80°, la désulfitation et la concentration à 65-70° sous pression réduite ; mais tandis que la pasteurisation n'est pas prolongée au-delà de 5 à 10 minutes, la désulfitation n'est effective qu'au bout de quinze à vingt minutes ; quant à la concentration, si on veut la faire à température aussi basse que possible, il faut prolonger le chauffage au-delà d'une heure. Or l'appauvrissement des jus en acides aminés par rapport aux teneurs du moût frais, va grossièrement en croissant du jus pasteurisé au mute et au concentré. Il est impossible cependant de tout expliquer par la durée de chauffage auquel ont été soumis les jus, car le jus muté qui, lui, n'a pas été chauffé du tout, a une composition très proche du jus désulfité pour certains acides aminés, et intermédiaire d'une façon générale entre jus pasteurisé et jus désulfité.

Nous pensons qu'il faut faire intervenir, au moins pour les modifications mineures, un autre facteur qui est tout simplement le vieillissement des jus ; les analyses des jus stabilisés ont été faites avec un recul de cinq à six mois par rapport aux jus frais ; elles se sont étalées sur deux à trois mois et elles ont été faites dans l'ordre où les résultats sont consignés dans le tableau ; ce qui pourrait expliquer une certaine progression des altérations constatées.

Il est évidemment difficile de dire ce qui revient à l'action du chauffage et ce qui est le résultat des transformations se faisant spontanément dans le jus.

Dans un cas, cependant, celui des jus concentrés, il nous semble que le chauffage prolongé joue le rôle principal et peut expliquer la chute importante des taux d'acides aminés. A mesure que le jus se concentre, le milieu s'enrichit proportionnellement en sucres et acides aminés et les conditions deviennent de plus en plus favorables à des reactions de Maillard ; on remarque d'ailleurs dans le jus en fin de concentration, le développement de colorations jaunâtres puis brunâtres, qui pourraient être celles des mélanoïdines décrites par MAILLARD.

En résumé, bien que nos essais n'aient porté que sur un nombre restreint d'échantillons, nous pensons pouvoir conclure qu'un chauffage relativement court des jus, en vue de leur conservation, n'est pas à redouter au point de vue de la composition en acides aminés. Vis-à-vis des techniques exigeant un chauffage prolongé, notre opinion sera plus nuancée car un tel traitement entraîne un appauvrissement sensible des jus.

-:-

CHAPITRE V

-:-

EVOLUTION DU TAUX DES ACIDES AMINES AU COURS DE LA VINIFICATION

-:-

Afin d'apprécier les modifications apportées dans le bilan des acides aminés par le processus spécialement important de la vinification, nous avons soumis certains échantillons de moûts à une vinification artificielle. Une fraction des moûts de Gros Vert et de Muscat (qui ont fait l'objet des analyses rapportées dans le chapitre précédent), a été ensemencée avec Saccharomyces ellipsoïdus, dans le but de préparer des vins blancs par égouttage et fermentation, des vins rouges par macération et fermentation.

Des vins spéciaux ont été préparés à titre expérimental, par fermentation tardive du moût stabilisé à la récolte : vin de moût concentré et redilué, vin de moût muté et désulfité. La pratique de la vinification des moûts mutés et désulfités est courante pour l'obtention de vins de coupage ; quant aux vins de concentrés, leur production pour la vente et la consommation n'est pas autorisée et il est peu vraisemblable qu'on obtienne par ces procédés des vins de qualité marchande acceptable ; cependant le projet en a été étudié. S'il était réalisable en effet, il permettrait de stocker le moût au moment de la vendange et d'étaler le travail de vinification sur une plus longue période, et il apporterait une solution facile au problème du transport du vin sous forme de moût stabilisé à vinifier.

Sur le plan strictement analytique, il était intéressant de savoir ce que pouvait être l'azote aminé de ces vins préparés par fermentation de moûts stabilisés, dont la composition en aci-

des aminés nous était connue.

Avant d'aborder les données chromatographiques, nous exposerons brièvement ci-après, comme nous l'avons fait pour les moûts, certains résultats de dosages purement chimiques, concernant notamment l'azote des vins, obtenus par nous ou relevés dans la bibliographie.

1) Dosages chimiques :

Au point de vue des caracteres analytiques, les vins obtenus au laboratoire répondaient aux normes usuelles des vins de consommation (+):

alcool	10° à 12,5°
densité	0,9817 à 0,9948
indice de réfraction	4,4 à 6,6
acidité totale	79 à 90 méq./l
sucres totaux	0,6 à 2,8 g/l

Les dosages chimiques des formes azotées dans les vins ont été faits suivant les méthodes indiquées pour les moûts (Tableau XVI).

Tableau XVI

en mg/l	Gros Vert		Muscat	
	vin rouge	vin blanc	vin rouge	vin blanc
N. total	133	112	101	84
N. ammoniacal	18,8	22,4	11	15
N. aminé (Sörensen)	19,4	16,4	15,4	12

(+) Les mesures à la base de ces données ont été déterminées par le laboratoire de Monsieur Dupaigne à l'Institut agronomique, que nous avons plaisir à remercier.

Le dosage de l'azote aminé par les méthodes chimiques :

Depuis GARINO-CANINA (cité par PEYNAUD (65)) il est classique de doser l'azote aminé des vins par voie chimique ; nous avons déjà rapporté plus haut la variabilité des résultats obtenus ; nous insistons encore sur la diversité des méthodes employées. Dans l'une de ces méthodes (Van Slyke à l'acide nitreux), utilisée par VENEZIA (in PEYNAUD (65)), HENNIG et OHSKE (36), SISAKYAN et coll. (77), on fait agir NO_2H sur le groupement aminé et on mesure l'azote dégagé. SISAKYAN et coll. ont employé parallèlement une autre méthode de Van Slyke : oxydation des groupements carboxyles par la ninhydrine, et mesure de CO_2 dégagé.

Le dosage des acides aminés par protométrie du carboxyle peut se faire soit en milieu alcoolique : méthode de Willstaetter utilisée par MUTH et WALSCH (54), soit après blocage de la fonction NH_2 par le formol. Cette dernière méthode due à SÖRENSEN, est la plus couramment employée : (GARINO-CANINA, PEYNAUD (65), VALAIZE et DUPONT (85), TARANTOLA (81), COLAGRANDE (22) ; CATALANO (21), BOURDET et HERARD (13), LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (40)). Nous y avons eu recours egalement pour doser l'azote aminé de nos échantillons, mais nous ne devons pas oublier que cette méthode n'a que la valeur d'un indice ("indice de formol" des jus de fruits), et qu'il est délicat de l'incorporer dans un bilan.

BOURDET et HERARD (13) ont comparé dans la même solution d'acides aminés séparés, l'azote aminé obtenu par formol-titration au potentio- Ph-mètre et l'azote calculé en faisant la somme des équivalents de tous les acides aminés dosés par chromatographie, et constaté une variation du simple au double.

Ce désaccord ne doit pas surprendre ; KOLTHOFF (39) admet que la méthode de Sörensen ne conduit à des résultats satisfaisants que pour le glycocolle et les acides aminés simples ; pour les autres, elle conduit à une approximation, ou même à des résultats erronés, c'est le cas des acides aminés à fonction aminée

secondaire (proline, histidine).(+)

Nous avons reporté dans le tableau ci-dessous (tableau XVII) les valeurs de l'azote aminé déterminées par formol-titration et celles obtenues à partir des dosages chromatographiques :

Tableau XVII

	Gros Vert				Muscat			
	J.press.	J.mix.	V.R.	V.Bl.	J. press.	J. mix.	V.R.	V. Bl.
N. aminé Sörensen (mg/l)	52,2	104,4	19,4	16,4	45,5	64,6	15,4	12
N. aminé Chromat. (mg/l)	82,4	116,3	55	51	43,8	60,7	29	20,1
Proline (% du total des A.A)	55	50	81	81	15	11	58	51

Bien que le calcul de l'azote à partir des dosages chromatographiques ne soit pas rigoureusement exact (quelques spots n'ont pu être évalués qu'approximativement), la comparaison des chiffres obtenus confirme ce que nous venons de dire : les taux d'azote aminé déterminés par les deux méthodes ne sont voisins que lorsque la proline représente moins de 20 % du total des aci-

---

(+) La méthode de Sörensen a connu un grand succès dans les recherches impliquant une inévitable approximation (cas des milieux complexes d'acides aminés divers : dosages d'intérêt biochimique sur des hydrolysats de protéines ; dosages d'intérêt clinique sur les liquides de l'organisme etc...). Or il a eté perdu de vue trop souvent que ce procédé a été établi en vue des seuls acides à fonction aminée primaire, dont la basicité du groupement NH_2 est effectivement masquée dans les conditions de l'expérience :

$$R\text{-}CH(NH_2)\text{-}CO_2H + HCHO \longrightarrow R\text{-}CH(N{=}CH_2)\text{-}CO_2H$$

des aminés ; quand la proportion de proline atteint 80 % (cas des vins de Gros Vert) l'azote aminé déterminé à partir des analyses chromatographiques est de beaucoup supérieur à l'azote aminé dû à la formol-titration.

Nous pensons avec BOURDET et HERARD (13) que cette façon d'exprimer l'azote aminé à partir des acides aminés dosés est plus recevable ; cependant nous n'obtenons pas dans nos échantillons des pourcentages aussi élevés que les leurs : l'azote aminé ainsi calculé représente 30 à 44 % de l'azote total dans la variété de raisin blanc et 21 à 28 % dans les échantillons préparés avec le Muscat.

2) Analyses chromatographiques, examen des résultats personnels

Les observations faites à propos des moûts sont valables pour les vins. Beaucoup d'acides aminés n'existent qu'à des taux peu élevés dans les vins étudiés, et la sensibilité de la méthode utilisée n'a pas permis de les déterminer avec exactitude, ainsi qu'il apparaît dans les tableaux XVIII et XIX.

A) Vins normaux

La proline est le seul acide aminé abondant dans les vins examinés. Elle représente 50 % du total des acides aminés dans les vins de Muscat et jusqu'à 80 % des acides aminés des vins de Gros Vert. La lysine est relativement bien représentée dans le Muscat, l'arginine, l'acide glutamique, l'alanine atteignent des taux encore dosables ; les autres acides aminés sont à l'état de traces ; quelques-uns ont même disparu. Seule la cystine appa-

---

... En revanche, les dérivés à fonction aminée secondaire, donnent dans les mêmes conditions naissance à une base méthylénique de molécule doublée dont la polarité basique, loin d'être affaiblie, est généralement augmentée :

$$>NH + HCHO + HN< \longrightarrow >N-CH_2-N<$$

L'action de l'aldéhyde va alors à l'encontre de la libération recherchée du carboxyle acide.

raît (dans les vins de raisin blanc) alors qu'elle était absente des moûts.

Nous n'avons pas constaté de différences évidentes entre les vins rouges et blancs ; la somme des acides amines dosés est à peine plus élevée dans les vins rouges. Les variations constatées entre les vins se rapportent plutôt au moût d'origine : taux de proline très élevé dans les deux vins de Gros Vert ; taux moyen dans ceux de Muscat (cependant un peu plus élevé dans le rouge que dans le blanc) ; lysine relativement abondante dans les vins de Muscat, mais dans le blanc comme dans le rouge.

B) Vins experimentaux :

a) Vins de jus mutés et désulfités :

Les mêmes acides amines sont présents dans les vins préparés à partir des jus mutés et desulfites que dans les vins normaux, mais à des taux plus faibles. La proline est encore l'acide aminé le plus abondant, bien qu'elle ait diminué de 30 et 50 % par rapport à son taux dans les vins ordinaires. Les teneurs en arginine, acide γ aminobutyrique, alanine, lysine, glycocolle, sont pratiquement les mêmes. Tous les autres acides aminés sont réduits à l'état de traces.

b) Vins de jus concentrés et redilues :

Les vins de concentrés sont des vins très appauvris ; on ne retrouve plus sur les chromatogrammes les taches d'acide γ aminobutyrique, acide glutamique, phénylalanine, tyrosine et même la proline, qui était particulièrement abondante dans tous les autres échantillons. Valine, leucine, thréonine, lysine, asparagine, glutamine, alanine et sérine, sont, selon les cas, ou absents du vin ou présents à des taux indosables. Quatre acides aminés seulement sont représentés à des taux voisins de ceux qui étaient les leurs dans les vins normaux : arginine, lysine, cystine, glycocolle.

La vinification qui s'effectue sur des jus déjà appauvris

Tableau XVIII

Taux des acides aminés dans les vins préparés à partir du raisin variété Gros Vert (en mg par litre)

Acide Aminé	Méthode d'évaluation	Jus de pressoir	Vin vinif. rouge	Vin vinif. blanc	Vin de muté désulfité	Vin de conc. redilué
proline	Gammes témoin sur papier (ACHER)	350	350	320	238	-
arginine+hist.	dosage selon FOWDEN	83	19	11	18	16
acide γ aminob.	"	57	6	5	6	-
acide glutam.	"	36	11	6	-	-
α alanine	"	35	9	7	6	4
valine	"	12	<5	6	<5	-
leucine+isol.	"	10	<5	8	t	-
phénylalanine	"	10	<6	9	t	-
sérine	"	6	4	<4	t	t
thréonine	"	6	<5	<5	t	-
acide aspartique	"	11	<5	<5	-	<5
lysine	"	7	<6	7	<6	t
ornithine	"	6	t	t	-	<5
glycocolle	"	3	4	3	7	8
glutamine	évaluation approchee sur chromato.	+	t	t	t	-
asparagine	"	+++	+	++	t	t
cystine	"	-	+	+	+	+
tryptophane	"	t	-	-	-	-
tyrosine	"	t	t	t	t	-
tache X	"	t	+	-	+	-
β alanine	"	-	-	-	t	-
acide pipécolique	"	t	-	-	-	-

Tableau XIX

Taux des acides amines dans les vins préparés à partir du raisin variété Muscat (en mg par litre)

Acide Aminé	Méthode d'évaluation	Jus de pressoir	Vin vinif. rouge	Vin vinif. blanc	Vin de muté désulf.	Vin de conc. redilué
proline	Gammes témoins sur papier (ACHER)	48	130	80	44	t
arginine+hist.	dosage selon FOWDEN	51	15	10	12	10
acide γ aminob.	"	42	6	10	8	-
acide glutam.	"	20	8	< 6	< 6	-
α alanine	"	23	10	8	10	t
valine	"	9	< 5	< 5	t	t
leucine+isol.	"	20	8	< 5	t	t
phénylalanine	"	12	< 6	< 6	t	-
sérine	"	15	4	t	t	t
thréonine	"	14	< 5	< 5	t	t
acide aspartique	"	11	-	-	t	t
lysine	"	19	25	20	15	13
ornithine	"	16	-	-	-	-
glycocolle	"	7	5	4	5	t
glutamine	évaluation approchée sur chromat.	-	-	-	-	-
asparagine	"	-	-	-	-	-
cystine	"	t	+	t	t	+
tryptophane	"	-	-	-	-	-
tyrosine	"	-	+	t	t	-
tache X	"	t	+	t	+	-
β alanine	"	-	-	-	-	-
acide pipécolique	"	-	-	-	-	-

conduit à des vins plus pauvres en acides amines et même beaucoup plus pauvres dans les cas des vins de concentrés que les vins normaux. Même en tenant compte du facteur vieillissement (les vins spéciaux étaient sensiblement plus vieux au moment de leur analyse que les vins ordinaires au moment de la leur), il semble que les essais entrepris en ce sens soient peu concluants, s'il est vrai comme le pensent MARKH et SHCHERBAKOVA (48) que les vins ayant les plus hautes qualités organoleptiques, sont ceux qui ont le plus grand nombre et la plus grande quantité d'amino-acides.

3) Comparaison des résultats avec les données bibliographiques :

Les travaux se rapportant à la recherche qualitative des acides aminés dans les vins sont déjà très nombreux. Nous en avons résumé les résultats sous forme de tableaux (Tableau V, Chapitre II).

Presque tous les auteurs reconnaissent la prédominance de la proline et l'abondance de l'acide glutamique et de l'alanine ; l'acide aspartique, les leucines, la sérine, la thréonine, le glycocolle, la valine, l'acide γ aminobutyrique sont pratiquement toujours présents. L'importance des acides aminés basiques dans le vin est plus discutée : taux élevé pour HENNIG et FLINTJE (35) et COLAGRANDE (22) ; faible quantité ou même absence pour les autres.

En 1958, CARLES et coll. (17) ont appliqué les techniques chromatographiques à divers échantillons de vins ; ils ont évalué chaque acide aminé en pourcentage du total de ces acides (voir tableau XX). Ces auteurs ont révélé des acides aminés peu ou pas signalés avant eux dans le vin : acide pipécolique, acide pyrrolidone-carboxylique, acide hydroxypipécolique, hydroxyleucine, méthionine-sulfone, méthionine-sulfoxyde, histamine.

Les premiers chiffres se rapportant aux teneurs des vins en acides amines sont dus à LUTHI et VETSCH (44) qui ont comparé

Tableau XX

Estimation quantitative des acides amines dans les vins

	mg/l	% du total des A.A.	mg/ℓ					
Acide Aminé	Luthi et Vetsch 1953	Carles et Lamazou 1958	Iwano 1957	Bourdet et Herard 1958 V.R.	Bourdet et Herard 1958 V.B.	Bidan et André 1958 val.extr.	Lafon-Lafoucade & Peyna 1959 val.moy. V.R.	Lafon-Lafoucade & Peyna 1959 val.moy. V.B.
α alanine	50->100	7-20	4,5	67	70	24-247		
β alanine		1-2						
acide α aminobutyrique				28	19			
acide γ aminobutyrique		1-25	t	3	5	23-90		
arginine		1-8	t	84	91	5-150	47	46
asparagine		0-1		56	41			
acide aspartique	6	1-8		76	72	0-107	31	38
cystéine		0-1						
cystine			4,0	106	47		17	25
glutamine		0-1		46	27	0-310		
acide glut.	3-15	3-9	4,3	334	315	44-270	221	200
glycocolle	5-8	1-6	t	12	16		28	26
histamine		?						
histidine		(+lys) 6-15	t	34	13	13-150	14	14
hydroxyleuc.		?						
acide hydrox. pipécol.		t-4						
isoleucine		2-12	t	36	24	32-198	26	29
leucine			t				19	19
lysine		(+hist) 6-15	6,4	43	37	20-248	47	40
méthionine		?		28	49		5	4
méthion.sulf.		?						
méthion.sulfoxyde						0-44		
ornithine		0-10						
phénylalanine		t-4		22	15	28-199	19	16
ac.pipécolique		t-10						
ac.pyrrolidone-carboxyl.		?						
oxyproline		0-4						
proline		8-40	20,7	531	770	445-1355	72	201
sérine	t-3	1-4	t	9	11	10-121	59	54
thréonine	20-25	t-3	4,7	27	32	15-107	187	111
tryptophane		0-3	0		0		2,5	0
tyrosine		0-5		32	37	23-120	11	13
valine		1-8		19	16	18-101	45	36

les taches obtenues sur les chromatogrammes à des échelles de témoins ; les taux sont peu élevés sauf pour l'alanine et la thréonine.

IWANO (37) au Japon, dose par chromatographie les acides aminés d'un vin rouge ; seule la proline atteint 20 mg, et la lysine 6,4 mg par litre ; les autres acides aminés sont à l'état de traces. Ses résultats sont donc comparables aux nôtres.

Cependant trois nouvelles séries de dosages d'acides aminés dans les vins ont conduit leurs auteurs à des chiffres nettement plus élevés. LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (40) ont analysé par des méthodes microbiologiques, onze échantillons de vins ; ils ont obtenu des taux de 200 mg/l pour l'acide glutamique et la thréonine des vins rouges, et pour la proline et l'acide glutamique des vins blancs. Arginine, lysine, sérine et valine sont encore présents à des taux de l'ordre de 50 mg/l.. Leurs résultats dans les vins et les moûts sont à rapprocher de ceux que CASTOR (19) avait obtenus, également par voie microbiologique dans les moûts de Californie. Il est à noter que les examens fondés sur la technique microbiologique correspondent à des modalités expérimentales radicalement différentes, ce qui peut expliquer la divergence des resultats. C'est pourquoi nous nous sommes souciée de confronter les méthodes chromatographique et microbiologique; le résultat de cette comparaison et son interprétation seront, pour plus de clarté, exposés en fin du présent chapitre.

Il n'en reste pas moins que BIDAN (5) et BOURDET (13) et leurs coll. ont obtenu des taux également élevés en opérant par chromatographie sur papier, et si la technique de coloration qu'ils utilisent, est un peu differente de la nôtre, le mode de séparation des acides aminés sur Permutite est identique. Il faut sans doute admettre avec la plupart des auteurs, une grande variété dans la composition aminée des vins selon le cépage. Nous en avons un exemple dans la teneur en proline des deux variétés de raisin que nous avons examinées : 350 mg dans le moût blanc,

48 mg dans le Muscat et cette différence se retrouve dans les vins correspondants ; BIDAN et ANDRE (5) ont étudié huit échantillons de vins blancs, mais dans le Traminer par exemple, les taux d'acides aminés sont jusqu'à cinq fois plus élevés que dans les autres échantillons.

Divers auteurs ont également insisté sur l'âge des vins ; l'azote aminé diminue avec le vieillissement ; l'abaissement est particulièrement rapide pour la proline.

Enfin LUTHI (43) a constaté des modifications importantes dans le vin au niveau des acides aminés après la fermentation malo-lactique.

Ces divers facteurs sont probablement responsables de la diversité des résultats obtenus.

4) Les transformations du moût au vin : influence de la fermentation

a) dans les vins normaux :

Si l'on compare les vins rouges et blancs, aux moûts qui ont servi à les préparer, on se rend compte des modifications profondes causées par la fermentation alcoolique au niveau des acides aminés.

La plupart d'entre eux diminuent et surtout ceux qui atteignaient les taux les plus élevés dans les moûts ; l'acide γ aminobutyrique, l'arginine, l'acide glutamique, l'alanine sont de trois à dix fois moins concentrés dans le vin. L'abaissement du taux des autres acides aminés est sensible, mais plus discret. Les amides, quand ils étaient présents dans le moût se retrouvent dans les vins, mais en quantité également plus faible.

Cependant, pour quelques acides aminés, les taux ne varient pas du moût au vin ou sont même en hausse ; c'est le cas du glycocolle, de la lysine (qui augmente de 25 % dans les vins de Muscat), et de la proline, stationnaire dans les vins de Gros Vert et augmentée de deux à trois fois dans les vins de Muscat

par rapport au moût.

Quant à la cystine, elle est présente dans tous les vins ; dans les vins de Gros Vert, elle se manifeste également alors qu'on ne l'avait pas révélée sur les chromatogrammes du moût.

Les auteurs qui ont comparé les vins et les moûts ne sont pas d'accord sur le sort de tous les acides aminés pendant la fermentation. Ils admettent le développement de la cystine un "intense développement" remarquent WEISS et coll. (86 et 87). La lysine et le glycocolle sont trouvés au même taux ou en augmentation dans les vins. Tous les auteurs constatent aussi la diminution importante de l'arginine et des amides et un abaissement plus ou moins marqué des taux de sérine et thréonine. Mais, la proline augmente du moût au vin pour LUTHI et VETSCH (44), CARBALLO (16), HENNIG et FLINTJE (33), CARLES et coll. (18) ; elle est inchangée pour CASTOR (20) ; elle diminue pour LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (40).

Les auteurs qui ont suivi les différentes étapes de la fermentation s'accordent à reconnaître que les acides aminés diminuent beaucoup (jusqu'à 90 %) les cinq ou six premiers jours excepté la proline, mais qu'ils sont susceptibles de réapparaître ensuite progressivement. Ce mécanisme se traduit selon les auteurs par un gain ou une perte de l'ensemble des acides aminés. Pour HENNIG et FLINTJE (35) les acides aminés sont moins abondants dans le moût que dans le vin ; ils seraient cédés par la levure au vin. LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (40) estiment que la composition aminée des vins est plus variée que celle des moûts, et que, si les levures consomment quelques-uns des acides aminés en proportion importante, elles libèrent par utilisation des peptides du moût et autolyse des cellules, de petites quantités de la plupart des autres acides aminés. CARLES et LAMAZOU (18) retrouvent pratiquement tous les acides aminés, sauf proline et lysine, diminués dans les vins. L'accord n'est donc général que sur le sort de quelques-uns des acides aminés.

Nous devons d'ailleurs tenir compte du fait que les vins

analysés ne correspondent pas toujours aux moûts. De plus, il est possible comme l'ont remarqué LUTHI et VETSCH (44) que la fermentation ne provoque pas toujours les mêmes phénomènes dans tous les moûts étudiés.

b) dans les vins expérimentaux :

Dans ces vins, cependant pauvres en acides aminés, la cystine est encore régulièrement présente. La fermentation se traduit par les mêmes modifications par rapport aux jus stabilisés de départ que dans le cas des vins normaux par rapport aux moûts. Il semble même que les processus se soient intensifiés. La plupart des acides aminés diminuent jusqu'à n'être plus qu'à l'état de traces dans les vins de désulfités et même jusqu'à disparaître dans les vins de concentrés. La proline dont la teneur avait baissé de moitié après le mutage, augmente de 25 à 50 % dans les vins de Gros Vert, tout au moins. Les taux de lysine sont du même ordre dans les vins de désulfités et dans les jus correspondants.

Les transformations mises en évidence dans les vins normaux après la fermentation se répètent donc dans les vins spéciaux, sauf dans un cas cependant : celui de la proline dans les vins de concentrés. Le taux de proline est sensiblement le même dans les jus concentrés et dans les jus désulfités ; mais, alors que dans les vins de désulfités ce taux est en augmentation, on ne retrouve plus cet acide aminé après fermentation des jus concentrés. La proline est un corps très sensible au vieillissement, mais les séries désulfitées et concentrées ont été préparées en même temps et les vins de deux catégories sont pratiquement du même âge. On peut se demander pourquoi dans le cas des deux vins de concentrés et dans ceux-là seulement, la fermentation a entraîné la disparition de la proline.

Nous avons vu que les jus concentrés sont des jus très appauvris. Lorsque les levures ne trouvent pas dans le moût les acides aminés qu'elles consomment habituellement, ne sont-elles pas capables d'en utiliser d'autres qui contribuent peu dans les cas

normaux à leur nutrition ? THORNE (84) a étudié le mode d'assimilation des acides aminés par la levure. Il a comparé l'intensité et la rapidité de la croissance de cette dernière dans les différents milieux : moûts, sels d'ammonium, acides aminés individuels. Les résultats figurent dans le tableau XXI. Chaque milieu expérimenté a été affecté d'un coefficient de valeur nutritive par rapport à celui du phosphate d'ammonium arbitrairement fixé à 100. Il ressort des travaux de l'auteur :

- que le meilleur milieu nutritif est évidemment le moût normal et dans ces conditions il semble que la levure assimile les acides aminés tels quels.

- que si les acides aminés sont présentés séparés comme seule source azotée à la levure, celle-ci doit d'abord les désaminer, puis, à partir de l'ammoniac libéré, réaliser la synthèse des acides aminés qui lui sont nécessaires.

Il apparaît à l'examen du tableau que les acides aminés ont des coefficients nutritifs variés. Cette variabilité s'expliquerait par leur plus ou moins grande facilité de désamination et par la différence de toxicité des sous-produits libérés. Ceux qui semblent convenir le mieux à l'alimentation de la levure expérimentée et au développement de la fermentation sont : asparagine, acide aspartique, acide glutamique, leucine, arginine et à un taux moindre : valine, proline, alanine.

On peut remarquer que les trois acides aminés qui ont sur le tableau le plus bas coefficient nutritif, sont précisément ceux que nous avons trouvés inchangés ou en augmentation du moût au vin : lysine, glycocolle, cystine.

Dans les moûts normaux que nous avons étudiés, les levures ont pu trouver parmi les acides aminés ayant un bon coefficient nutritif selon THORNE : de l'arginine à doses assez élevées, un peu d'acide glutamique, d'acide aspartique et de leucine et dans le cas du Gros Vert, de l'asparagine, plus des taux plus ou moins

Tableau XXI

Valeurs nutritives relatives des différentes sources azotées (S. cerevisiae) d'après THORNE (84)

Milieu :	coefficient :
moûts	150-200
phosphate d'ammonium	100
asparagine	142
acide aspartique	128
acide glutamique	104
leucine	87
arginine	87
valine	78
proline	69
alanine	68
isoleucine	65
méthionine	64
phénylalanine	64
sérine	59
tyrosine	58
tryptophane	49
hydroxyproline	42
histidine	31
cystine	22
glycocolle	15
lysine	8

élevés des autres acides aminés.

Le jus désulfité renfermait ces acides aminés aux mêmes doses excepté l'asparagine. Quant au jus concentré, au départ de la fermentation, il contenait moitié moins d'arginine que le moût normal et le jus désulfité, et des taux affaiblis d'acide glutamique, acide aspartique, leucine, asparagine, ce qui pourrait peut-être expliquer que la levure ait été amenée à consommer la proline, seul acide aminé important dans le milieu, ayant encore un coefficient nutritif valable (=69).

Cette interprétation du mode d'assimilation des acides aminés n'est peut-être qu'une hypothèse qui ne saurait rendre compte de tous les aspects du métabolisme azoté de la levure et elle demanderait à être vérifiée sur un nombre plus élevé d'échantillons de moûts normaux et de moûts appauvris.

De nos essais nous pouvons cependant conclure que l'influence de la fermentation sur le devenir des acides aminés, se traduit par les mêmes phénomènes dans tous les moûts expérimentés sauf dans les moûts concentrés très appauvris.

I°- Pour un premier groupe de phénomènes que nous avons constatés : taux maintenu ou augmenté de : glycocolle, lysine, cystine, taux abaissé d'arginine, amides, acides aminés à fonction alcool, nous rejoignons les conclusions de tous les auteurs.

2°- Mais nous avons encore remarqué que la proline restait inchangée et que pratiquement tous les autres acides aminés diminuaient de façon plus ou moins sensible du moût au vin ; sur ces dernières modifications, nous l'avons dit, l'accord n'est pas général.

L'hypothèse de THORNE que nous venons d'exposer, permettrait d'expliquer, dans une certaine mesure, que les modifications entraînées par la fermentation puissent légèrement différer d'une expérience à l'autre selon la composition aminée du moût de départ. Elle rendrait compte aussi du comportement inhabituel des

levures en présence d'un moût appauvri.

5) Observation relative aux Techniques : comparaison des dosages chromatographique et microbiologique d'acides aminés.

La confrontation des résultats bibliographiques et expérimentaux rapportés ci-dessus fait ressortir entre autres désaccords, une dénivellation importante entre les données de la chromatographie et celles de la microbiologie. A priori ces différences sont explicables du fait que les modalités de dosage ne sont pas parfaitement superposables ; il n'en reste pas moins que les auteurs font pourtant état des uns et des autres dans leurs comparaisons. C'est ainsi que notre attention a été attirée sur les travaux d'une équipe de chercheurs (40) qui a dosé par voie microbiologique les acides aminés des moûts et des vins. Nous avons pensé qu'il serait intéressant de confronter les résultats que nous donnait la chromatographie avec ceux, obtenus par ailleurs, par les méthodes microbiologiques classiques.

I° - Nous avons d'abord appliqué notre méthode de dosage chromatographique à une solution d'acides aminés témoins, qui avait été testée par microbiologie à la Station Agronomique de Bordeaux, sous la direction de Monsieur le Professeur GENEVOIS. Les résultats des deux méthodes étaient comparables.

2° - Ce sont ensuite les acides aminés de trois échantillons de vins qui ont été dosés par les deux méthodes. Excepté pour la proline et l'alanine, les résultats sont alors très différents ; les chiffres obtenus par voie microbiologique sont beaucoup plus élevés que ceux dus à la chromatographie. Nous avons encore constaté que les écarts entre les résultats des deux méthodes sont généralement du même ordre pour le même acide aminé dans les trois échantillons; écart important entre les taux de : sérine, glycocolle et surtout thréonine; écart sensible dans le cas de : leucine-isoleucine, phénylalanine, acide glutamique.

Puisque les taux sont régulièrement majoritaires dans le cas des résultats dus à la microbiologie, il est logique de pen -

ser que les microorganismes utilisent en plus des acides aminés libres, ceux des petits peptides qui figurent dans la composition des vins naturels. Cette notion a déjà été suggérée par certains auteurs ; LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (40) avaient été amenés à envisager cette possibilité en comparant l'azote aminé chimique et microbiologique dans leurs échantillons ; RIESEN (75) avait signalé que, si dans une protéine on dose les acides aminés par voie microbiologique à mesure que se fait l'hydrolyse, on s'aperçoit que le taux maximum d'acides aminés est obtenu avant le taux maximum d'α NH_2-N libre.

Il faut donc s'attendre à ce que les deux méthodes appliquées à des dosages dans des milieux biologiques, ne donnent pas toujours des résultats superposables. La chromatographie permet de doser les seuls acides aminés libres ; par voie microbiologique, on définit en quelque sorte une activité, une valeur biologique qui correspond à l'azote aminé assimilable, et si cette valeur est délicate à préciser au point de vue du chimiste, elle est évidemment d'un intérêt plus immédiat pour l'oenologue et le biologiste.

Dans l'étude d'un vin, les deux méthodes utilisées parallèlement, permettent d'ailleurs une representation plus objective de ses diverses formes azotées. L'azote aminé calculé à partir des résultats chromatographiques correspond à l'azote aminé libre, tandis que celui déterminé d'après les dosages microbiologiques, représente en plus de cet azote aminé libre celui des polypeptides assimilables ; cette dernière valeur retranchée des polypeptides totaux permet d'évaluer encore les polypeptides non assimilables par les microorganismes.

-:-

CONCLUSIONS

-:-

Dans ce travail qui a pour objet l'étude des acides aminés dans le raisin et le vin nous avons orienté nos recherches dans deux directions principales :

I°- le choix d'une technique propre à l'identification et au dosage d'acides aminés

2°- l'interprétation des résultats obtenus par cette méthode.

Quand nous avons commencé notre étude, la chromatographie était une méthode relativement récente, mais dont la souplesse et le grand pouvoir discriminant, avaient déjà séduit nombre de chercheurs. Nous avons pensé que la chromatographie sur papier, par la simplicité de son emploi et la possibilité qu'elle offre de retrouver des doses infimes de composés définis, conviendrait à l'étude que nous nous proposions. Elle s'est révélée en effet, une méthode simple et élégante de caractérisation des acides aminés. Mais le passage au stade quantitatif est quelque peu décevant, nous avons dû le reconnaître. Les techniques proposées sont nombreuses, c'est dire qu'elles sont imparfaites. Et il semble qu'elles soient désavantagées par l'apparition de méthodes plus rapides et plus précises de répartition et de dosage sur colonnes, réalisées depuis peu de temps dans certains laboratoires, par un appareillage entièrement automatique. Mais cet appareillage, par ailleurs onéreux, était inconnu il y a quelques années; et, pour que tous nos résultats soient comparables, nous avons choisi de rester fidèle à la chromatographie sur papier. Après avoir neutralisé au maximum les causes de perturbation que nous ont révélées nos essais, et scrupuleusement délimité les condi-

tions d'emploi de la méthode, nous pensons avoir mis au point, non pas une technique idéale, mais un moyen de travail recevable dont l'application au matériel d'étude choisi, nous permet d'énoncer plusieurs conclusions, qui seront rappelées ci-dessous. Notons auparavant combien il est curieux de constater que si la réaction de coloration ninhydrine-groupement-amine, que nous utilisons, est d'une application journalière au laboratoire, son mécanisme demeure à peu près inconnu. Nous pensons que les travaux, récemment entrepris par une équipe de chercheurs pour étudier les différentes phases de cette réaction, contribueront beaucoup à préciser quel est le rôle exact et l'importance relative de tous les facteurs pouvant intervenir dans cette réaction de coloration ; et la chromatographie sur papier, au cours de laquelle des manipulations assez nombreuses soumettent le matériel à colorer aux variations de conditions extérieures, semble devoir bénéficier de ces renseignements, plus encore que la chromatographie sur colonne, où la coloration se développe au sein des tubes de téflon.

Il est donc possible que d'autres techniques soient proposées dans un proche avenir et à notre avis on pourra prétendre à de meilleurs résultats, quand on saura écrire les étapes intermédiaires de cette réaction à la ninhydrine.

Il nous reste maintenant à exposer les résultats de notre travail. L'application d'une technique qualitative ou seulement grossièrement quantitative, nous a permis de caractériser, dans un vin français de grande consommation, les acides aminés habituels des substances alimentaires, à des taux peu élevés d'ailleurs ; nous avons mis en évidence dans le vin la cystine et le tryptophane, qui n'avaient été caractérisés jusqu'alors que dans les moûts. De l'étude d'une série de jus commerciaux, nous avons pu conclure que les moûts étaient sensiblement plus riches en azote aminé que les vins, mais aussi que la comparaison des résultats était rendue très délicate par la diversité de cépages des raisins d'origine.

C'est en tenant compte de ces observations, que dans la suite de notre travail, en même temps que nous rendions la méthode quantitative, nous avons décidé de suivre le devenir des acides aminés dans des vins et des jus dont les moûts de départ nous étaient connus. Cette condition nous a semblé indispensable, bien qu'elle nous ait obligée à réduire le nombre des échantillons analysés.

La série des préparations obtenues à partir du raisin vert se caractérise dès le départ par sa grande richesse en proline ; les chromatogrammes de moûts de Muscat présentent un aspect inhabituel dû à quelques acides aminés identifiables à côté des taches allongées qui ont été identifiées à de petits peptides et qui ont facilement cédé à une hydrolyse ménagée.

Les jus préparés par passage des grains de raisin au mixer, nous ont appris que la majeure partie de la réserve azotée, se trouvait en fait dans la pellicule et les pépins. L'homogénéisation des grains permettrait donc l'obtention d'un jus plus riche en acides aminés, mais malheureusement aussi plus chargé en tanins et d'un aspect trouble. Nous nous contenterons de poser aux spécialistes la question de l'opportunité de la préparation des "jus de raisins complets"...

Il n'était pas sans intérêt de comparer l'influence des divers modes de stabilisation des jus de raisin sur la teneur en acides aminés de ces derniers. La composition aminée des jus pasteurisés reproduit assez fidèlement celle des moûts frais ; c'est à ce mode de conservation qu'on doit donner si possible la préférence. Les techniques exigeant un chauffage prolongé sont plus à redouter car un tel traitement entraîne un appauvrissement sensible des jus et nos résultats ont mis en évidence qu'il faut incriminer plus encore la durée que la température de ce chauffage.

Enfin nous avons étudié par chromatographie le devenir des acides aminés du moût après fermentation alcoolique. Beaucoup de travaux ont été publiés sur les substances azotées du vin, mais

leurs conclusions sont le plus souvent en désaccord.

Désaccord sur la composition du bilan azoté du vin, que certains auteurs estiment impossible à compléter : une fraction importante de l'azote total ne pourrait être identifiée. Nous avons rappelé à ce sujet que les dosages chimiques de l'azote aminé des vins sont peu spécifiques et qu'il convient de ne donner aux chiffres obtenus par la méthode classique de Sörensen que la valeur d'un indice.

Désaccord aussi sur les taux des divers acides aminés, et sans doute peut-on l'expliquer par le cépage des vins, leur âge, les modifications apportées par la fermentation malo-lactique lorsqu'elle a eu lieu et enfin, les méthodes de dosages employées. La confrontation que nous avons faite, des résultats de dosages d'acides aminés par la méthode microbiologique et la méthode chromatographique, dans les mêmes échantillons de vin, le prouve ; les résultats ne sont pas exactement superposables : par chromatographie, on dose les seuls acides aminés libres, alors que la microbiologie permet d'évaluer, en plus de ces acides aminés, les petits polypeptides assimilables du milieu.

Désaccord des auteurs enfin au sujet de l'influence de la fermentation sur le destin des divers acides aminés. Nous avons constaté avec la majorité des auteurs, d'une part, le maintien ou l'augmentation des taux de glycocolle et lysine et même l'apparition possible de la cystine ; d'autre part, l'abaissement des teneurs en arginine, amides et acides aminés à fonction alcool. Mais la fermentation s'est encore traduite dans nos essais par une chute importante de : acide γ aminobutyrique, acide glutamique, alanine et un abaissement plus discret de la plupart des taux des autres acides aminés, alors que la proline reste inchangée. Et ces modifications ne sont pas reconnues par tous les auteurs.

On pourrait penser que la fermentation ne provoque pas toujours les mêmes phénomènes dans tous les moûts ; peut-être le com-

portement des levures est-il dans une certaine mesure tributaire de la composition du milieu dans lequel elles se développent. L'examen des vins spéciaux que nous avons préparés à partir des jus désulfités et des jus concentres, semble le confirmer. Dans ces vins la fermentation se traduit par les mêmes modifications que dans les vins normaux, à une exception près, celle de la proline, qui disparaît dans les vins de concentrés et dans ceux-là seulement. Or les jus concentrés sont les plus appauvris ; si les levures ne trouvent pas dans le moût, les acides aminés qu'elles consomment habituellement, peut-être sont-elles aptes à en utiliser d'autres de coefficient nutritif inférieur, comme ce serait le cas de la proline.

Cette hypothèse, en admettant qu'elle se vérifie sur un nombre plus élevé de moûts ne saurait rendre compte de l'ensemble des mécanismes du métabolisme azoté des levures ; elle pourrait cependant contribuer à éclairer l'un des aspects de ce phénomène complexe qu'est la fermentation alcoolique.

-:-

Paris le 15 Novembre 1961

Vu et Permis d'Imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
signé :

Vu :
Le Doyen :
signé : VALETTE

BIBLIOGRAPHIE

-:-

(1) R. ACHER, C. FROMAGEOT et M. JUTISZ
Biochim. biophys. Acta, 1950, 5, 81

(2) H. de ALMEIDA
Anais Inst. Vinho Porto, 1954, 15, 1

(3) M.A. AMERINE
Adv. Food Res. 1954, 5, 353

(4) K. ASO, K. SHIBASAKI, K. MATSUDA, T. NAKAYAMA, F. YAMAUCHI, A. SASAKI, S. IWASA et S. HAMADA
J. agric. chem. Soc. Jap. 1954, 28, n°7, 503

(5) P. BIDAN et L. ANDRE
Ann. Technol. agric. 1958, Ser. E, 7, 403

(6) D.S. BIDMEAD et F.J. LEY
Biochim. et biophys. Acta 1958, 29, 562

(7) G. BISERTE, J.W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOUE et P. SAUTIERE
J. Chromatogr. 1959, 2, 225

(8) G. BISERTE, T. PLAQUET-SCHOONAERT, P. BOULANGER et P. PAYSANT
J. Chromatogr. 1960, 3, 25

(9) R.J. BLOCK, E.L. DURRUM and G. ZWEIG
A manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, Acad. Press N.Y. 1955

(10) R.J. BLOCK, R. le STRANGE and G. ZWEIG
Paper Chromatography, A laboratory manual, Acad. Press N.Y. 1952

(11) P. BOULANGER et G. BISERTE
Exp. ann. Bio. Médicale, 1950, 11, 53

(12) P. BOULANGER et G. BISERTE
Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 1930

(13) A. BOURDET et J. HERARD
Ann. Technol. agric. 1958, Ser. E. 7, 177
(14) J. BRETON
Thèse Doct. Méd. Ed. Drouillard Bordeaux, 1958
(15) F. BUSSON, R. CARBIENER et J. LANZA.
Ann. Nutrit. Aliment. 1960, 2, 1
(16) J. CARBALLO CAABEIRO
Ann. Inst. nacion. Invest. agron. 1956, 5, 195
(17) J. CARLES et M. LAMAZOU-BETHEDER
C.R. Acad. Sci. 1958, 247, 2181
(18) J. CARLES, M. LAMAZOU-BETHEDER et R. PECH
C.R. Acad. Sci. 1958, 246, 1254
(19) J.G.B. CASTOR
Food Res. 1953, 18, 139 et 146
(20) J.G.B. CASTOR et T.E. ARCHER
Amer. J. Enol. 1956, 7, 19
(21) M. CATALANO
Pubbl. univ. Bari, Ann. facoltà agrar. 1957, 11; 357
(22) O. COLAGRANDE
Ann. Fac. Agrar. Univ. cattol. S. Cuore, Milano, Ser. 5, 1957, 53, 84
(23) R. CONSDEN, A.H. GORDON et A.J.P. MARTIN
Biochem. J. 1944, 38, 224
(24) P.N. DIMOTAKIS
Chim. Chronika 1955, 20, 102
(25) O.J. DRAPER et A.L. POLLARD
Science 1949, 109, 448
(26) G. DUPONT
Ann. Technol. agric. 1953, Ser.E, 2, 95
(27) G. FILTEAU et F. MARTEL
Rev. canad. Biol. 1956, 15, 212
(28) L. FOWDEN
Biochem. J. 1951, 48, 327

(29) J.A. GAUTIER
Bull. Acad. nation. Méd. 1955, 139, 497

(30) J.A. GAUTIER, et J. GUENEE
Soc. Chim. Biol. 1954, Pr. Verbal séance du 16 nov.

(31) L. GENEVOIS
Bull. Soc. Chim. 1954, 450

(32) L. GENEVOIS et J. RIBEREAU-GAYON
Ann. Ferment. 1936, 1, 541

(33) A.V. GERASIMOVA et P.P. DIKHTYAR
Vinodelie i Vinogradarstvo S.S.S.R. 1953, 13, n°4, 12

(34) K. HENNIG
Z. Lebensmittel-Unters. u.-Forsch, 1944, 87, 40

(35) K. HENNIG et S.M. FLINTJE
Wein-Wiss. Beihefte Deut. Weinbau 1954, 8, 121 et 129

(36) K. HENNIG et P. OHSKE
Vorratspflege u. Lebensmittelforsch 1942, 5, 408

(37) S. IWANO
Nippon Jôzô kyôkai Zasshi 1957, 52, 569

(38) J. KOCH et H. SCHWAHN
Z. Lebensmittel-Unters. u.-Forsch. 1958, 107, 521

(39) I.M. KOLTHOFF et V.A. STENGER
Volumetric Analysis, Interscience Publishers N.Y.
1947, vol.II, p.161

(40) S. LAFON-LAFOURCADE et E. PEYNAUD
Vitis 1959, 2, 45

(41) A.J. LANDUA et J. AWAPARA
Science 1949, 109, 385

(42) E. LEDERER et M. LEDERER
Chromatography, Elsevier Publ. Co Amsterdam, 1953 et 1957

(43) H. LUTHI
Rev. fermentations et inds.aliment. 1957, 12, 15

(44) H. LUTHI et U. VETSCH
Schweiz. Zeits. Obst. Weinbau, 1952, 61, 390 et 405
et Deut. Weinbau, Wissensch. Beihefte 1953, 7, n°1, 3
n°2, 33

(45) M. MACHEBOEUF
Bull. Assoc. Diplômés Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 1953, 50, 4

(46) L.C. MAILLARD
C.R. Acad. Sci. 1912, 154, 66

(47) P. MALANGEAU
Techn. Pharm. 1956, 9

(48) A.T. MARKH et E.V. SHCHERBAKOVA
Vinodelie i Vinogradarstvo S.S.S.R. 1958, 18, 11

(49) H. MEYER
Biochem. J. 1957, 67, 333

(50) S. MOORE, D.H. SPACKMAN et W.H. STEIN
Federation Proc. 1958, 17, 1107
Anal. Chem. 1958, 30, 1185

(51) S. MOORE et W.H. STEIN
J. Biol. Chem. 1948, 176, 367

(52) S. MOORE et W.H. STEIN
J. Biol. Chem. 1951, 192, 663

(53) S. MOORE et W.H. STEIN
J. biol. Chem. 1954, 211, 907

(54) F. MUTH et L. MALSCH
Z. Untersuch. Lebensm. 1934, 68, 487

(55) E. NEUZIL et J.C. BRETON
Bull. Mém. Ec. nation. Méd. Pharm. Dakar, 1956, 4, 204

(56) E. NEUZIL et J.C. BRETON
Bull. Mém. Ec. nation. Med. Pharm. Dakar, 1957, 5, 251

(57) E. NEUZIL, J.C. BRETON et H. PLAGNOL
Bull. Mém. Ec. nation. Méd. Pharm. Dakar, 1958, 6, 162 et 169 - 1959, 7, 157 et 195

(58) A.I. OPARIN et E.N. BEZINGER
Biokhimija 1949, 14, 291

(59) A.I. OPARIN, E.N. BEZINGER et I. BATSYNA
Biokhimija 1945, 10, 311

(60) A.I. OPARIN, A.L. KURSANOV, N.F. SAENKO et E.N. BEZINGER
Vinodelie i Vinogradarstvo S.S.S.R. 1946, 6; n°5, 12

(61) S.M. PARTRIDGE et coll.
Biochem. J. 1949, 44, 418 et 521
1950, 46, 334

(62) R.J. PELTONEN, M. KITUNEN et H. SWOMALAINEN
Z. Lebensmittel-Unters. u.-Forsch 1958, 107, 15

(63) A. PEREIRA et J.A. SERRA
Science 1951, 113, 387

(64) E.A. PETERSON et H.A. SOBER
Anal. Chem. 1959, 31, 857

(65) E. PEYNAUD
Ann. Falsif. Fraudes 1939, 32, 228

(66) E. PEYNAUD
Rev. vitic. 1939, 90, 189 et 213

(67) E. PEYNAUD
Ann. agron. 1950, Ser. A, 1, 252 et 382

(68) E. PEYNAUD et G. GUIMBERTEAU
C.R. Acad. Sci. 1959, 248, 868

(69) E. PEYNAUD et A. MAURIE
Ann. Technol. agric. 1953, Ser. E, 2, 15

(70) C.G. POPE et M.F. STEVENS
Biochem. J. 1939, 33, 1070

(71) F. PRILLINGER
Mitteilungen, 1957, Sér. A7, 3, 138

(72) M. PROCOPIO et M.T. CALE
Riv. viticolt. e. enol. (Conegliano), 1954, 7, 12

(73) R.R. REDFIELD
Biochim. biophys. Acta 1953, 10, 344

(74) J. RIBEREAU-GAYON et E. PEYNAUD
Analyse et Contrôle des Vins, Béranger éd. Paris,
1951 et 1958

(75) W.H. RIESSEN, B.S. SCHWEIGERT et C.A. ELVEHJEM
J. Biol. Chem. 1946, 165, 347

(76) E. SCHWERDTFEGER
Angew. Chem. 1958, 70, 188

(77) N.M. SISAKYAN et E.N. BEZINGER
Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R. 1949, 69, 573

(78) N.M. SISAKYAN et E.N. BEZINGER
Biokhimija, 1950, 3, 85

(79) N.M. SISAKYAN et E.N. BEZINGER
Biokhimija, 1953, 18, 412

(80) N. SUBRAMANIAN et M.V. LAKSHIMINARAYAN RAO
J. Sci. industr. Res. 1955, 14, 56

(81) C. TARANTOLA
Accad. ital. vite e vino 1954, 6, 146

(82) C. TARANTOLA et R. LOVISOLO
Ann. sper. agrar. (Rome), 1955, 9, 167

(83) J.F. THOMPSON, R.M. ZACHARIUS et F.C. STEWARD
Plant Physiol. 1951, 26, 375

(84) R.S.W. THORNE
J. Inst. Brew. 1949, 55, (46 N.S.) 201

(85) H. VALAIZE et G. DUPONT
Industr. aliment. agric. 1951, 68, 245

(86) H. WEISS, A. ROUSSET et R. BONNET
C.R. Acad. Sci. 1959, 249, 1796

(87) H. WEISS, A. ROUSSET, M.T. MAILLARD et R. BONNET
C.R. Acad. Sci. 1960, 250, 1322

(88) A.J. WOIWOD
Biochem. J. 1948, 42, XXVIII
Nature, 1948, 161, 169

Bibliographie arrêtée fin mars 1961

-:-

TABLE DES MATIERES

-:-

pages

Introduction 1

Chapitre 1 - METHODE DE RECHERCHE DES ACIDES AMINES PAR CHROMATOGRAPHIE ET APPLICATION DU VIN 13

1/ Travaux antérieurs 13

2/ Travaux personnels 14

A) séparation des acides aminés 15

B) chromatographie sur papier 17

3/ Confrontation des résultats 18

Chapitre II - RECHERCHE DES ACIDES AMINES ET ESTIMATION DE LEUR TAUX; APPLICATION AU JUS DE RAISIN. 25

1/ Mise au point bibliographique 26

2/ Adaptation de la technique personnelle aux déterminations quantitatives 31

3/ Résultats dans une série de jus commerciaux 34

Chapitre III - DOSAGE DES ACIDES AMINES DANS LE JUS DE RAISIN ET SES PRODUITS DE TRANSFORMATION. 41

1/ Préparation des échantillons 42

2/ Etude des méthodes de dosage 44

3/ Choix d'une technique opératoire 46

A) méthodes essayées 46

B) technique adoptée 48

Chapitre IV - APERCU SUR L'EVOLUTION DU TAUX DES ACIDES AMINES AU COURS DE DIVERSES TRANSFORMATIONS DU MOUT. MOUTS FRAIS ET JUS CONSERVES 59

1/ Les dosages chimiques 59

2/ Analyses chromatographiques 60

3/ Examen des résultats et comparaison avec les données bibliographiques 64

pages

A) les moûts 64

B) les jus de mixer 69

C) les jus conservés 70

Chapitre V - EVOLUTION DU TAUX DES ACIDES AMINES AU COURS DE LA VINIFICATION 75

1/ Dosages chimiques 76

2/ Analyses chromatographiques et examen des résultats personnels 79

3/ Comparaison des résultats avec les données bibliographiques 83

4/ Les transformations du moût au vin : influence de la fermentation 86

5/ Observation relative aux techniques: comparaison des dosages chromatographique et microbiologique d'acides aminés. 92

Conclusions 94

Bibliographie 99

-:-